

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

#### Application diagnostique de l'utilisation des mimotopes de la chaîne O du lipopolysaccharide de Brucella

Hanosset, Delphine

*Award date:*  
2003

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



---

**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**APPLICATION DIAGNOSTIQUE DE L'UTILISATION DES MIMOTOPES DE LA CHAÎNE  
O DU LIPOPOLYSACCHARIDE DE *BRUCELLA***

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
licencié en Sciences biologiques**

Delphine HANOSSET

Juin 2003



Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix  
FACULTE DES SCIENCES  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20  
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

## Application diagnostique de l'utilisation des mimotopes de la chaîne O du lipopolysaccharide de *Brucella*

HANOSSET Delphine

### Résumé

*Brucella* est une bactérie intracellulaire facultative responsable d'une zoonose à incidence mondiale. Les tests couramment utilisés lors d'un diagnostic mettent en évidence la présence d'anticorps spécifiques de l'antigène majoritaire de surface, le lipopolysaccharide de cette bactérie. Un inconvénient rencontré lors du diagnostic de la brucellose repose sur la parenté antigénique du lipopolysaccharide de *Brucella* avec celui d'autres bactéries comme *Yersinia enterocolitica* O:9, rendant difficile la discrimination d'une infection par ces deux bactéries.

Nous avons utilisé des mimotopes sélectionnés à partir de banques de peptides présentés à la surface de phages par trois anticorps monoclonaux spécifiques de la chaîne O du LPS de *Brucella* (l'AcM 2C8, 6B3 et 12B12). Nous avons testé en ELISA la reconnaissance de ces mimotopes par des séras de souris infectées expérimentalement par *Brucella*.

Six mimotopes donnent un signal significativement supérieur au contrôle négatif. Par la suite, nous avons essayé d'inhiber la liaison des anticorps monoclonaux aux mimotopes par l'ajout des séras de souris infectées. Seul l'anticorps monoclonal 12B12 était déplacé par les anticorps des souris infectées par *B. melitensis* 16M et *B. abortus* biovar 9 sur un de ces six mimotopes.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2003

Promoteur: J.-J. Letesson

*Je tiens tout d'abord à remercier le professeur J.-J. Letesson de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire pour ce travail.*

*Garçon, merci ! Et oui, tu m'as tout appris... Les mimotopes, ce n'est pas une vaste blague...*

*Merci à P. Renard, F. Liners, B. Damien, et P. Mertens d'avoir consacré du temps à la lecture critique de ce travail.*

*Je voudrais également remercier Nath, Chantal, Calou, Amé, Sophie, Godefroid, Valérie, Marie, Marie, Rose-May, Etienne, Zette, Régis, Xavier, Caroline, Steph, Allan, Stéphane ainsi que toutes les autres personnes du labo pour, dans le désordre, les dépannages informatiques, les discutes, les conseils, les vendredis après-16h, les petites vannes, les tournées « dagos », les tournées « coca », les corrections, et j'en oublie... Ce fût un plaisir de travailler avec vous.*

*Merci également aux autres anciens boulets comme moi, Fred (Et gamin, fils de Lucien...) pour ton amitié, Matija pour les délires jardinerie et nombreux mails (Et blablabla...), Violaine, Christophe, John et Céline. Nous y sommes arrivés !*

*Je n'oublie pas les amis, Audrey, Vi, Marion, Violette, Fred, Matija, Jérémie, Den, Jean-Mi, Alex, Fabien, et tous les autres. Ces années sont inoubliables, les guindailles, les délires, les pleurs, les joies.*

*Mes remerciements vont également à ma famille, sans qui, et non, je ne serais pas là, Papa, Maman, Aline, Thomas, Nico, Sandrine, Arthur. Bon-papa et bonne-maman, Grand-papa et Grand-maman également pour les blocus passés à leurs petits soins. Vous avez tous toujours répondu présent et m'avez soutenue dans toutes mes entreprises. Merci.*

*Delphine*

*...ou « Jo », à toutes les sauces...*



# Table des matières

TABLE DES MATIÈRES .....	1
ABRÉVIATIONS .....	3
INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX .....	4
INTRODUCTION .....	5
<b>1. LIPOPOLYSACCHARIDE DE <i>BRUCELLA</i></b> .....	<b>5</b>
1.1. <i>Brucella</i> .....	5
1.2. Structure du LPS .....	5
1.3. Antigénicité du LPS .....	6
1.4. Mise en évidence d'épitopes sur le LPS .....	7
1.4.1. Définition fonctionnelle .....	7
1.4.2. Définition structurale .....	8
1.4.3. Paradoxes des épitopes de la chaîne O .....	8
1.4.4. Utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques pour le typage d'espèces .....	9
<b>2. DIAGNOSTIC ET BRUCELLOSE</b> .....	<b>9</b>
2.1. Spécificité et sensibilité d'un test diagnostique .....	9
2.2. Diagnostic de la brucellose .....	10
2.2.1. Les diagnostics directs .....	10
2.2.2. Les diagnostics indirects .....	11
2.3. Problèmes liés au diagnostic .....	13
<b>3. MIMOTOPES ET DIAGNOSTIC</b> .....	<b>14</b>
3.1. Mimotopes .....	14
3.1.1. Sélection .....	14
3.1.2. Intérêts .....	15
3.2. Mimotopes diagnostiques .....	16
3.2.1. Mimotopes sélectionnés avec des anticorps monoclonaux .....	16
3.2.2. Mimotopes sélectionnés avec des sera .....	17
3.2.3. Exemples .....	17
<b>4. DONNÉES PRÉLIMINAIRES ET OBJECTIF DU TRAVAIL</b> .....	<b>19</b>
RÉSULTATS ET DISCUSSION .....	21
<b>1. INFECTION DE SOURIS</b> .....	<b>21</b>
<b>2. TEST DES DIFFÉRENTS SERA SUR BACTÉRIES ENTIÈRES ET SUR LE S-LPS DE <i>BRUCELLA</i> ET <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i> O:9</b> .....	<b>22</b>
2.1. ELISA sur les bactéries .....	22
2.1.1. <i>Yersinia enterocolitica</i> O:9 .....	22
2.1.2. <i>Brucella abortus</i> 544 .....	23
2.1.3. <i>Brucella melitensis</i> 16M .....	23
2.1.4. <i>Brucella abortus</i> biovar 9 .....	23
2.2. ELISA sur les différents LPS .....	24
2.2.1. LPS de <i>Brucella melitensis</i> 16M (M dominant) .....	24
2.2.2. LPS W99 (A dominant) .....	24
2.2.3. LPS de <i>Yersinia enterocolitica</i> O:9 .....	25
2.3. Problèmes rencontrés avec <i>Brucella abortus</i> 544 et <i>Yersinia enterocolitica</i> O:9 .....	25
2.3.1. <i>Brucella abortus</i> 544 .....	25
2.3.2. <i>Yersinia enterocolitica</i> O:9 .....	26
<b>3. TEST DES DIFFÉRENTES SAIGNÉES SUR LES PEPTIDES MIMOTOPES PRÉSENTÉS À LA SURFACE DE PHAGE</b> .....	<b>27</b>
3.1. ELISA indirect sur les mimotopes .....	28
3.2. ELISA en triplicat .....	29
<b>4. TEST DES SERA EN INDIVIDUEL</b> .....	<b>30</b>
4.1. ELISA indirect sur les mimotopes .....	30
4.1.1. Souris infectées par <i>Brucella melitensis</i> 16M (Bm 16M 0 à Bm 16M 7) .....	30
4.1.2. Souris infectées par <i>Brucella abortus</i> biovar 9 (Ba BV9 0 à Ba BV9 7) .....	31
4.1.3. Souris ayant reçu du PBS (PBS 0 à PBS 3) .....	31
4.2. ELISA indirect sur le LPS .....	31



4.2.1. Souris infectées par <i>Brucella melitensis</i> 16M (Bm 16M 0 à Bm 16M 7).....	32
4.2.2. Souris infectées par <i>Brucella abortus</i> biovar 9 (Ba BV9 0 à Ba BV9 7).....	32
4.2.3. Souris ayant reçu du PBS (PBS 0 à PBS 3).....	32
4.3. Comparaison des réponses anti-mimotope et anti-LPS.....	33
<b>5. COMPÉTITION ENTRE LES ANTICORPS DES SÉRA ET LES ANTICORPS MONOCLONAUX.....</b>	<b>34</b>
<b>6. INHIBITION AVEC LES PEPTIDES MIMOTOPES LIBRES.....</b>	<b>36</b>
<b>7. INHIBITION AVEC LE LPS SOLUBLE.....</b>	<b>37</b>
7.1. ELISA d'inhibition.....	37
7.2. ELISA de déplacement.....	38
7.3. Vérification de l'inhibition.....	38
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>40</b>
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>42</b>
<b>1. INFECTION DE SOURIS.....</b>	<b>42</b>
1.1. <i>Yersinia enterocolitica</i> O:9.....	42
1.1.1. Vérification de la présence du plasmide de virulence.....	42
1.1.2. Préparation des doses infectantes.....	42
1.1.3. Infection des souris.....	43
1.1.4. Dilutions sériées et comptage des doses infectantes.....	43
1.2. <i>Brucella</i> .....	43
1.2.1. Préparation des doses infectantes.....	43
1.2.2. Infection des souris.....	43
1.2.3. Dilutions sériées et comptage des doses infectantes.....	44
1.3. Récupération des séras.....	44
1.4. Récupération des rates.....	44
1.5. Test au cristal violet.....	45
1.6. Coloration de GRAM.....	45
<b>2. PRODUCTION DE PHAGES ET ÉVALUATION DE LA QUANTITÉ DE PHAGES PRODUITS.....</b>	<b>46</b>
2.1. Préparation de phages (Système phagemide) : vecteur pC89.....	46
2.2. Préparation de phages (Système phage) : vecteur Fd Tet.....	47
2.3. Évaluation du nombre de particules phagiennes.....	48
<b>3. ELISA INDIRECT (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY).....</b>	<b>48</b>
<b>4. ELISA DE COMPÉTITION.....</b>	<b>49</b>
<b>5. INHIBITION.....</b>	<b>50</b>
<b>6. BIOTINYLATION D'ANTICORPS.....</b>	<b>51</b>
<b>7. DOSAGE PROTÉIQUE : BCA.....</b>	<b>52</b>
<b>ANNEXE 1.....</b>	<b>54</b>
<b>ANNEXE 2.....</b>	<b>55</b>
<b>ANNEXE 3.....</b>	<b>56</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>58</b>

## Abréviations

µg	Microgramme
Amp	Ampicilline
BSA	Bovine Serum Albumine
CFT	Test de fixation du complément
CFU	Colony forming unit
CPA	Cellule présentatrice d'antigènes
CTL	Contrôle
DO	Densité Optique
DTT	Dithiotréitol
EDTA	Acide éthylène diamine tetra acétique
ELISA	Enzyme-Linked immunosorbent assay
GAM-HRP	Goat anti-mouse couplé à la Horse Raddish Peroxydase
HCV	Virus de l'hépatite C
HPV	Papillomavirus humain
IDR	Intradermoréaction
IFN-γ	Interféron gamma
Ig	Immunoglobuline
IG	Intra-gastrique
IM	Intra-musculaire
IP	Intra-péritonéal
IPTG	Isopropyl-thio beta D thiogalactoside
Kan	Kanamycine
LPS	Lipopolysaccharide
ml	Millilitre
MOX	Magnésium Oxalate
MOX-RC	Magnésium Oxalate Red-Congo
Nal	Acide nalidixique
D-Rha4Nfo	4,6-dideoxy-4-foramido-D-mannopyranosyl
nm	Nanomètre
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Reaction en chaîne de la polymérase
PEG	Polyethylene glycol
pYV	Plasmid <i>Yersinia</i> virulence
RA	Arthrite Rhumatoïde
RBT	Test au Rose Bengale
R-LPS	Lipopolysaccharide rugueux
rpm	Rotation par minute
RSFPs	Réactions Sérologiques Faussement Positives
RT	Test de l'anneau
S2 Ba BV9	Sera des souris infectées par <i>B. abortus</i> 544 provenant de la deuxième saignée, après 5 semaines
S2 Bm 16M	Sera des souris infectées par <i>B. melitensis</i> 16M provenant de la deuxième saignée, après 5 semaines d'infection
S2 PBS	Sera des souris non infectées provenant de la deuxième saignée, après 5 semaines
SAT	Test de séro-agglutination
S-LPS	Lipopolysaccharide lisse
Tet	Tétracycline
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
YOPs	<i>Yersinia</i> outer membrane proteins



# Index des figures et tableaux

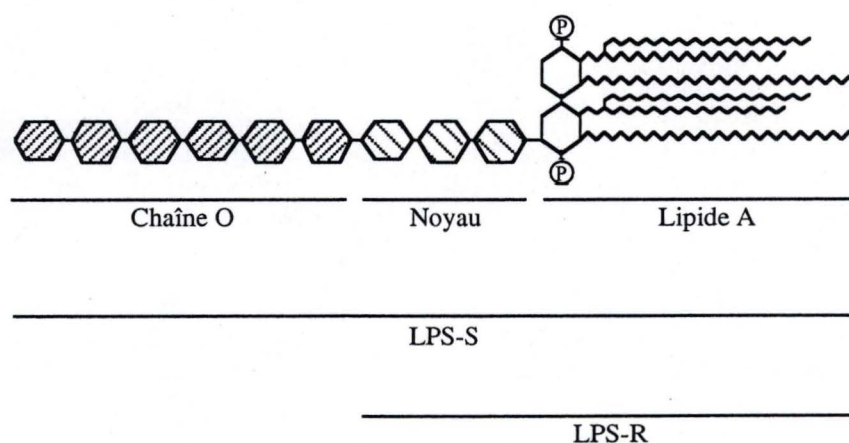
Tableau 1	Espèces et biovars de <i>Brucella</i> .....	5
Tableau 2	Sérotypes.....	6
Tableau 3	Profils de liaison d'anticorps monoclonaux.....	8
Tableau 4	Tests sérologiques.....	11
Figure 1	Représentation schématique du LPS.....	5
Figure 2	Structure des chaînes O de <i>Brucella</i> .....	5'
Figure 3	Antigènes, épitopes.....	6
Figure 4	Prédiction de la structure des épitopes A, M et C/Y .....	7
Figure 5	Production d'anticorps monoclonaux.....	7
Figure 6	Intradermoréaction et test à l'interféron gamma.....	12
Figure 7	Mimotopes.....	14
Figure 8	Phage filamenteux.....	14
Figure 9	Sélection et amplification de phages.....	15
Figure 10	ELISA indirect sur bactéries tuées.....	23
Figure 11	ELISA indirect sur les LPS.....	24
Figure 12	ELISA indirect sur les mimotopes.....	28
Figure 13	ELISA indirect en triplicat sur les mimotopes.....	29
Figure 14	ELISA indirect en individuel sur le LPS et les mimotopes.....	31
Figure 15	ELISA de compétition.....	34
Figure 16	ELISA de compétition.....	35
Figure 17	ELISA d'inhibition avec les mimotopes libres.....	36
Figure 18	ELISA d'inhibition avec les mimotopes libres.....	37
Figure 19	ELISA d'inhibition avec le LPS.....	38
Figure 20	ELISA d'inhibition avec le LPS.....	39
Figure 21	ELISA d'inhibition sur le LPS avec le LPS.....	39'
Figure 22	Protocole ELISA indirect.....	48
Figure 23	Protocole ELISA de compétition.....	49
Figure 24	Protocole ELISA d'inhibition.....	50
Figure 25	ELISA sur les différentes préparations de phages. Annexe 2..	55
Figure 26	ELISA d'inhibition sur les mimotopes. Annexe 3.....	56
Figure 27	ELISA de déplacement. Annexe 3.....	56
Figure 28	ELISA d'inhibition sur le LPS. Annexe 3.....	57



# INTRODUCTION

Espèces	Biovars	Morphologie des colonies	Hôte(s) naturels	Sérotypes
<i>B. abortus</i>	1	Lisse	Bovins	A+M-
	2	Lisse		A+M-
	3	Lisse		A+M-
	4	Lisse		A-M+
	5	Lisse		A-M+
	6	Lisse		A+M-
	7	Lisse		A+M+
	8	Lisse		A-M+
	9	Lisse		A-M+
<i>B. melitensis</i>	1	Lisse	Chèvre, mouton	A-M+
	2	Lisse		A+M-
	3	Lisse		A+M+
<i>B. suis</i>	1	Lisse	Porc	A+M-
	2	Lisse		A+M-
	3	Lisse		A+M-
	4	Lisse	Renne, caribou	A-M+
	5	Lisse	Rongeur	A-M+
<i>B. neotomae</i>	-	Lisse	Rat du désert	A+M-
<i>B. canis</i>	-	Rugueuse	Chien	-
<i>B. ovis</i>	-	Rugueuse	Ovins	-

**Tableau 1:** Différentes espèces et biovars du genre *Brucella*, leur morphologie, hôtes naturels et sérotype. D'après Young (1995) et Alton *et al.* (1998).



**Figure 1 :** Représentation schématique du LPS. Il se compose du lipide A, d'un core ou noyau et de la chaîne O. Le LPS dit rugueux (R-LPS) ne possède pas de chaîne O, contrairement au LPS lisse (S-LPS).



# Introduction

## 1. Lipopolysaccharide de *Brucella*

### 1.1. *Brucella*

Les bactéries du genre *Brucella* sont responsables d'une zoonose mondiale. Ce sont des bactéries intracellulaires facultatives, qui peuvent infecter plusieurs espèces d'animaux et l'homme.

Les propriétés phénotypiques utilisées afin de caractériser *Brucella* incluent la morphologie des colonies, l'antigénicité (cfr point 1.3), la virulence, le taux de croissance, la sensibilité aux sels et aux bactériophages ainsi que la résistance aux antibiotiques et aux colorants. Ces caractéristiques et l'adaptation aux différents hôtes ont été utilisés pour diviser le genre *Brucella* en 6 espèces, dont trois ont été subdivisées en biovars<sup>1</sup> [1] (Tableau 1).

Les principales espèces pathogènes pour l'homme sont *B. abortus*, responsable de la brucellose bovine ; *B. melitensis*, agent étiologique principal des brucelloses ovine et caprine ; et *B. suis*, responsable de la brucellose porcine. Ces trois souches provoquent l'avortement des femelles gestantes, la stérilité des mâles et donc des pertes économiques importantes.

### 1.2. Structure du LPS

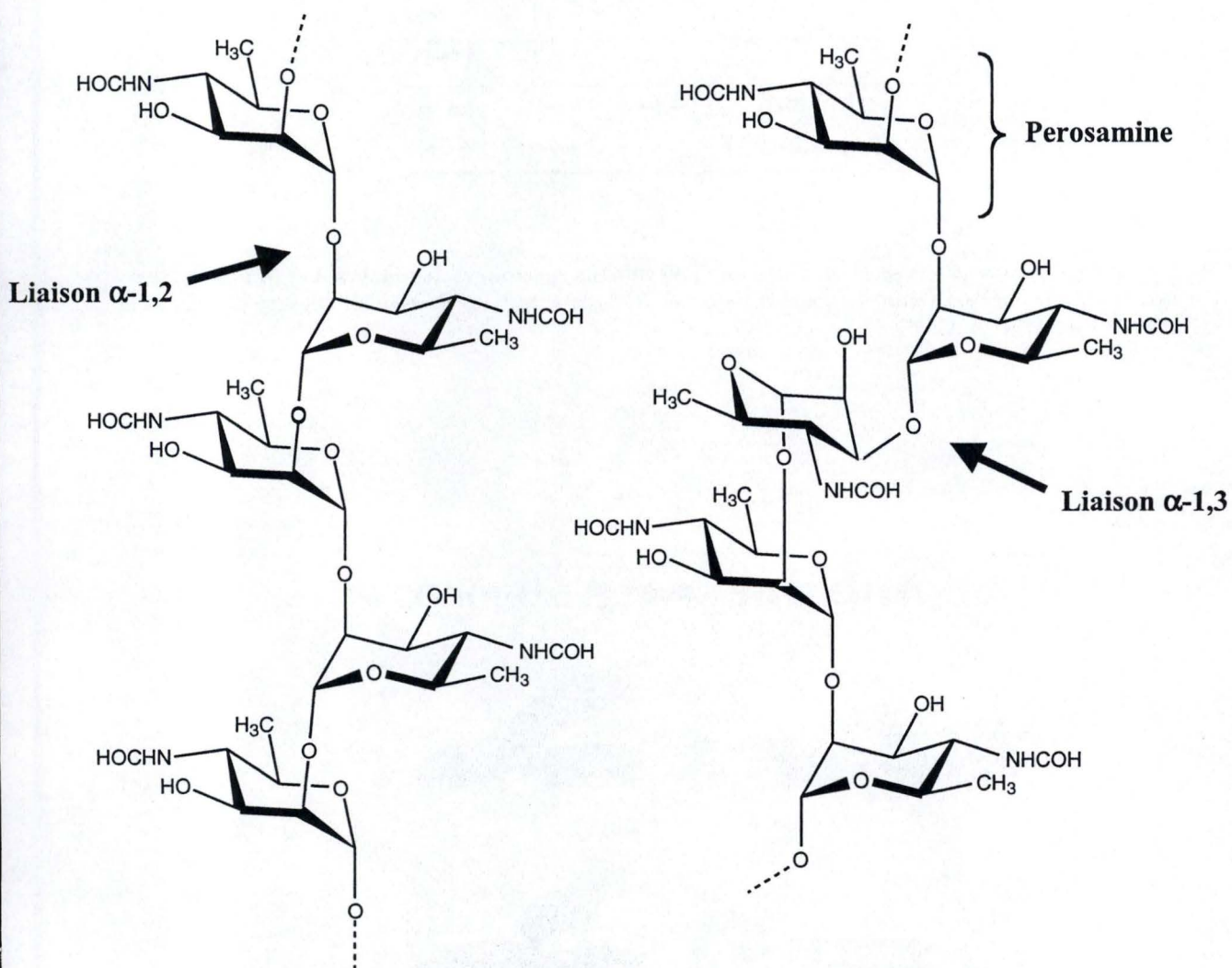
Le lipopolysaccharide (LPS) est une structure présente au niveau de la couche externe de toutes les bactéries à Gram négatif, dont *Brucella*. Une partie hydrophobe de la molécule est enchâssée dans le feuillet externe de la membrane externe, l'autre pôle est hydrophile et reste en surface. Cette molécule est formée de trois parties, le lipide A, le core et la chaîne O [2] (Figure 1).

Le **lipide A** est la portion hydrophobe du LPS servant d'ancrage membranaire. Chez *Brucella* (*abortus*), il est composé d'un squelette de dimères de 2,3-diamino-2,3-dideoxy-D-glucose liés en  $\beta$ -1,6. Sur cette structure saccharidique sont greffées plusieurs molécules d'acides gras saturés à 12, 14, 16 et 18 carbones par des liaisons amines et esters. Les hydroxyles des disaccharides du lipide A sont souvent substitués par des phosphates.

Le **core** est formé d'une courte série de sucres, attachés sur un des sucres aminés du lipide A. Il est composé de glucose, de mannose, de 2-amino-2,6-didéoxy-D-glucose (quinovosamine), de 2-amino-2-déoxy-D-glucose (glucosamine), de sucres non identifiés et d'une faible quantité de 3-déoxy-D-mannose-2-octulosonate (Kdo).

La **chaîne O** est un homopolymère non branché de 4,6-dideoxy-4-formamido-D-mannopyranosyl (D-Rha4Nfo ; N-formylperosamine) pour les espèces *B. abortus* et *B. melitensis*. La chaîne O est une répétition de N-formylperosamine liés en  $\alpha$ -1,3 et en  $\alpha$ -

<sup>1</sup> Biovars pour « variants biologiques ».



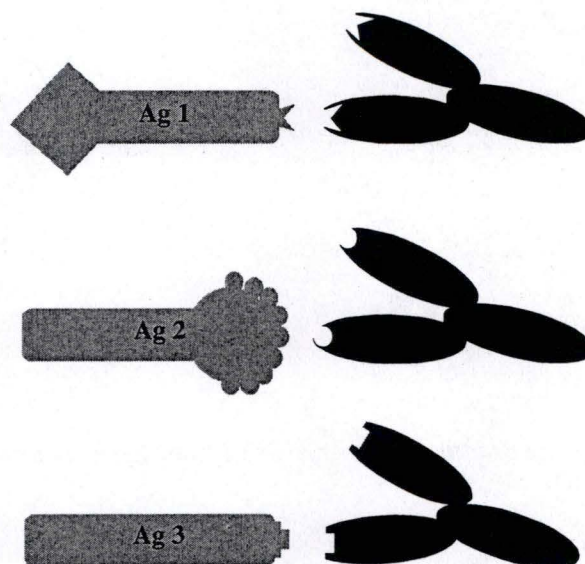
**Figure 2 :** Structure des chaînes O de *Brucella abortus* biovar 1 (à gauche) et de *Brucella melitensis* biovar 1 (à droite). D'après Bundle *et al.*, 1989.



	A <sup>+</sup> M <sup>-</sup>	A <sup>-</sup> M <sup>+</sup>	A <sup>+</sup> M <sup>+</sup>
Sérum anti-A	+++	+	+++
Sérum anti-M	+	+++	+++

**Tableau 2:** Détermination des sérotypes. Des sera polyclonaux spécifiques de souches A et M dominantes permettent de caractériser toutes les souches de *Brucella*. Leur réactivité vis-à-vis de ces sera détermine le sérotype (A<sup>+</sup>M<sup>-</sup>, A<sup>-</sup>M<sup>+</sup> et A<sup>+</sup>M<sup>+</sup>).

## Antigène ↔ Anticorps



**Figure 3:** Les antigènes sont formés d'une mosaïque de déterminants antigéniques, les épitopes. Ce sont les épitopes qui sont reconnus par les anticorps et les récepteurs des cellules T et non la molécule antigénique dans son ensemble.

1,2. Chez *Brucella abortus* biovar 1, on ne retrouve que 2 % de liaisons  $\alpha$ -1,3, alors que chez *Brucella melitensis* biovar 1, on en retrouve 20 % [3-7] (Figure 2).

Néanmoins, toutes les bactéries ne présentent pas de chaîne O, les souches dites **rugueuses** (R pour Rough) ne possèdent pas cette structure, tandis que les souches lisses (S pour Smooth) la présentent (Figure 1).

### 1.3. Antigénicité du LPS

En 1932, Wilson et Miles ont indiqué que les différences sérologiques entre *Brucella abortus* biovar 1 et *Brucella melitensis* biovar 1 étaient attribuées à deux antigènes de surface, un **antigène A** prédominant chez *Brucella abortus* biovar 1 et un **antigène M** prédominant chez *Brucella melitensis* biovar 1, et que ceux-ci présentaient une cross-réactivité, donc des éléments communs [8].

La nomenclature des souches lisses de *Brucella* A ou M dominantes est basée sur l'expression majoritaire de ces antigènes à leur surface. La classification A ou M dominante repose sur la différence quantitative de la distribution des antigènes A et M. Trois **sérotypes** différents ont été défini sur base de tests d'agglutination avec des sera polyclonaux spécifiques A ou M :  $A^+M^-$ ,  $A^-M^+$  et  $A^+M^+$  (Tableau 2) [9]. Une souche A dominante ( $A^+M^-$ ) réagira de manière préférentielle avec un sérum anti-A. Il en va de même pour une souche M dominante avec un sérum anti-M. Les souches  $A^+M^+$  réagissent de manière égale avec les deux sera.

Des études ultérieures ont démontré que les antigènes A et M étaient associés aux divers composants saccharidiques de la chaîne O du LPS des *Brucella* lisses [10].

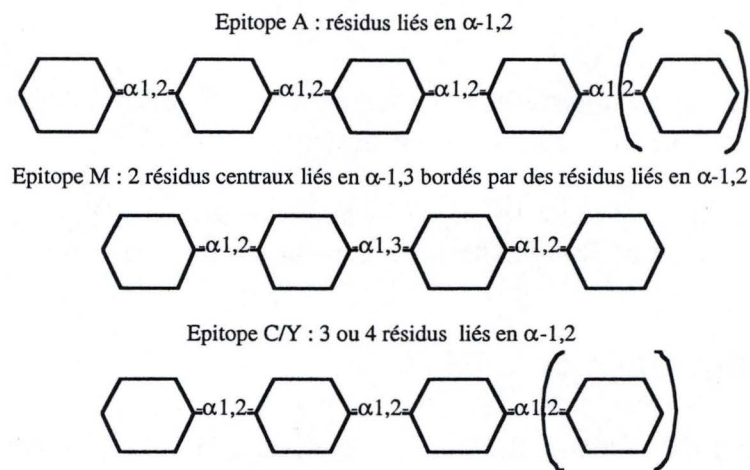
La structure chimique de ces antigènes a été proposée par Bundle et ses collaborateurs [3-7], les différences d'antigénicité existantes entre les souches semblent corrélées avec la quantité relative de liens  $\alpha$ -1,3 et  $\alpha$ -1,2 qu'elles présentent sur leur chaîne O. Les souches A dominantes ( $A^+M^-$ ) contiennent 2 % de liaisons  $\alpha$ -1,3, les souches M dominantes ( $A^-M^+$ ) contiennent 20 % de liaisons  $\alpha$ -1,3 et les souches  $A^+M^+$  en contiennent 10 % [3].

Le lipopolysaccharide lisse est l'antigène<sup>2</sup> immunodominant<sup>3</sup>. Les anticorps dirigés contre cet antigène sont les premiers à apparaître en cas d'infection par une *Brucella* lisse. C'est pourquoi le diagnostic de la brucellose est couramment basé sur la détection d'anticorps dirigés contre le S-LPS.

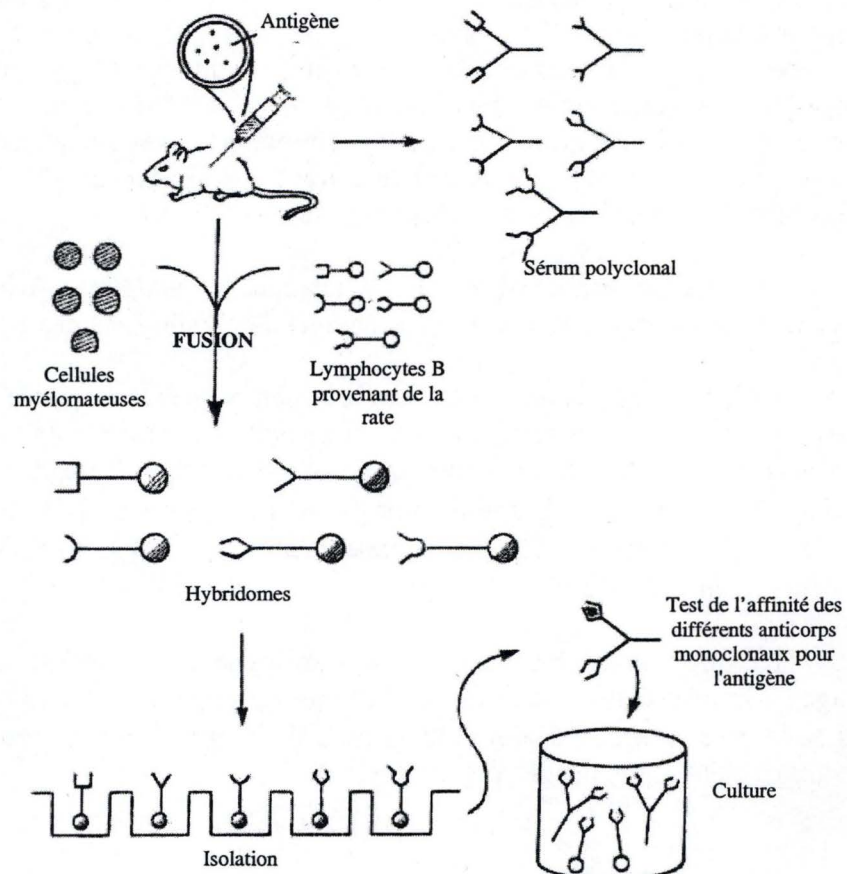
<sup>2</sup> Antigène : molécule qui réagit avec les récepteurs des cellules T et B ou avec des anticorps préformés. Il est composé d'une mosaïque de déterminants antigéniques, les épitopes (Figure 3).

<sup>3</sup> Immunodominant : contre lequel la majorité de la réponse immunitaire est dirigée.





**Figure 4 :** Prédiction de la structure des épitopes A, M et C/Y. D'après Bundle *et al.*, 1989.



**Figure 5 :** Production d'anticorps monoclonaux. Suite à l'injection d'antigène, la souris produit des anticorps dirigés contre différents épitopes présents sur cet antigène. Les lymphocytes B de la rate sont récupérés et fusionnés à des cellules myélomateuses. Les hybridomes résultant de cette fusion et sécrétant les anticorps monoclonaux dans le surnageant sont alors isolés. Les anticorps monoclonaux de chaque culture sont ensuite testés pour la reconnaissance d'un épitope particulier.

## 1.4. Mise en évidence d'épitopes<sup>4</sup> sur le LPS

### 1.4.1. Définition fonctionnelle

#### 1.4.1.1. Inhibition avec des oligosaccharides synthétiques

En 1989, Bundle a défini trois épitopes sur le S-LPS de *Brucella*. Pour cela, il a utilisé une série d'anticorps monoclonaux<sup>5</sup> ainsi que des oligosaccharides synthétiques. Il a caractérisé trois profils de liaison de ses anticorps monoclonaux [7].

Un premier groupe était spécifique de l'antigène A, il fallait cinq résidus de N-formylperosamine liés en  $\alpha$ -1,2 pour inhiber la liaison de ces anticorps monoclonaux au S-LPS de *Brucella abortus* biovar 1. Il en a déduit que la structure de l'épitope reconnu par ses anticorps monoclonaux était donc cinq résidus de N-formylperosamine liés en  $\alpha$ -1,2.

Un deuxième groupe avait une affinité égale pour les antigènes A et M. Celui-ci était inhibé par des oligosaccharides composés de trois ou quatre résidus N-formylperosamine liés en  $\alpha$ -1,2. De la même manière que pour le premier groupe, il a déduit la structure de l'épitope reconnu (3 ou 4 résidus liés en  $\alpha$ -1,2).

Le dernier groupe d'anticorps monoclonaux était spécifique de l'antigène M, et était inhibé par la présence d'un disaccharide de N-formylperosamine lié en  $\alpha$ -1,3 entouré par deux résidus liés en  $\alpha$ -1,2 (Figure 4).

#### 1.4.1.2. Définition d'épitopes par profil de liaison d'anticorps monoclonaux sur le O-PS

Par ailleurs, d'autres chercheurs ont défini ces épitopes en analysant la réactivité de différents anticorps monoclonaux pour les différents O-PS de souches de *Brucella* ainsi que d'autres bactéries comme *Yersinia enterocolitica* O:9. Sur base des différentes réactivités des anticorps monoclonaux, ils sont parvenus à définir différents épitopes [11-18].

Par exemple, Weynants et ses collaborateurs (1996) ont défini en tout sept épitopes présents sur la chaîne O du LPS de *Brucella* par l'étude de liaisons d'anticorps monoclonaux aux S-LPS de *Yersinia enterocolitica* O:9, *Brucella abortus* W99 (souche A dominante) et *Brucella melitensis* Rev1 (souche M dominante) [18]. Le tableau 3 reprend la liste des anticorps monoclonaux, leur affinité pour les différents LPS et les épitopes auxquels ils sont associés. Les **épitopes C** sont communs à toutes les souches lisses de *Brucella* [12, 13], les **épitopes A** et **M** sont spécifiques respectivement des souches A et M dominantes, les **épitopes C/Y** sont communs à toutes les *Brucella* lisses et *Yersinia enterocolitica* O:9.

<sup>4</sup> Épitopes : Motifs moléculaires reconnus par des anticorps et les récepteurs de lymphocytes T et B.

<sup>5</sup> Anticorps monoclonaux : anticorps provenant d'un clone unique de lymphocyte B (Figure 5). Ils sont obtenus par culture d'hybridomes, c'est-à-dire de clones de lymphocytes B fusionnés avec des myélomes.



Mab	Classe Ig	S-LPS Rev1		S-LPS W99		S-LPS 09		Epitope reconnu	PS Rev1		PS W99	
		Titre	DO	Titre	DO	Titre	DO		Titre	DO	Titre	DO
16C10	IgG3	1.500	2.598	59	1.773	40	910	C/Y (M>A)	340	1.235		43
16A4E7	IgG3	530	2.595	250	2.545	44	910	C/Y (M=A)	200	766		71
4F9	IgG3	10 <sup>4</sup>	2.451	10 <sup>5</sup>	2.676	10 <sup>4</sup>	2.582	C/Y (M<A)		50	>10 <sup>4</sup>	2.880
15B1G10	IgG3	1.700	2.516	55	960		4	C (M>A)	250	1.335		17
12G12	IgG1	9.800	2.828	8.900	2.748		108	C (M=A)	104	>3.000	5.600	>3.000
6B3B2	IgG3	260	1.810		16		3	M		142		32
2C8C4	IgG3		19	1.700	2.536		91	A		23		21

**Tableau 3 :** Profils de liaison des anticorps monoclonaux (Mab) au S-LPS Rev1 (LPS M dominant), au S-LPS W99 (LPS A dominant) et au S-LPS de *Yersinia enterocolitica* O:9 ainsi qu'aux polysaccharides seuls (PS). Ces résultats sont obtenus en test ELISA avec les surnageants d'hybridomes. La densité optique (OD) est mesurée avec les surnageants dilués 9 X. Le titre est la réciproque de la dilution pour laquelle on obtient une DO de 0,2. D'après Weynants *et al.*, 1997.

*Yersinia enterocolitica* O:9 possède un LPS dont la chaîne O est composée des résidus de N-formylperosamines liés uniquement en  $\alpha$ -1,2 [19], ce qui explique la cross-réaction avec certains anticorps monoclonaux dirigés contre la chaîne O de *Brucella*.

Finalement, des expériences de compétition entre anticorps monoclonaux suggèrent que certains de leurs épitopes ont des structures qui se chevauchent [18].

### 1.4.2. Définition structurale

D'autres auteurs se sont également intéressés à l'existence de ces épitopes en adoptant une approche structurale, par résonance magnétique nucléaire, cristallographie, etc. [3, 4, 19-21].

### 1.4.3. Paradoxes des épitopes de la chaîne O

Énormément d'informations au sujet de la structure de la chaîne O de *Brucella* et de ses épitopes sont disponibles. Certaines sont contradictoires.

#### 1.4.3.1. Épitope M

La présence de l'épitope M a été mise en relation avec l'existence des liaisons  $\alpha$ -1,3 entre les résidus de N-formylperosamine. Bundle a défini cet épitope comme deux résidus de N-formylperosamine liés en  $\alpha$ -1,3 entourés de deux résidus de N-formylperosamine liés en  $\alpha$ -1,2 (Figure 4) [7]. Par ailleurs, Meikle et ses collaborateurs ont démontré la présence de liaisons  $\alpha$ -1,3 en faible quantité chez *Brucella abortus* biovar 1 [3]. Comment expliquer alors pourquoi des anticorps monoclonaux définis comme spécifiques de l'épitope M (03E05, 18B04, 04F03 [17]; 6B3B2 [18]; Bm2-15, Bm3-2, Bm3-7 et Bm3-8 [7]) ne reconnaissent pas *Brucella abortus* biovar 1 ?

Pour terminer, certains auteurs ne sont pas parvenus à mettre en évidence la présence de liaisons  $\alpha$ -1,3 chez *Brucella abortus* biovar 1 [22].

#### 1.4.3.2. Épitope A

La structure de l'épitope A est également contradictoire. Il était défini à l'origine comme présent uniquement chez *Brucella abortus* biovar 1. Plusieurs anticorps monoclonaux spécifiques de l'épitope A sont également capables de reconnaître *Yersinia enterocolitica* O:9 (4F9, [18, 23]). Ceci a été expliqué par le fait que l'épitope A est défini comme un pentasaccharide de N-formylperosamine liés en  $\alpha$ -1,2, structure présente sur la chaîne O de cette bactérie. Néanmoins, Weynants et ses collaborateurs ont montré qu'un de leurs anticorps monoclonaux spécifique de la chaîne O de *Brucella abortus* biovar 1 (le 2C8) ne reconnaissait pas le LPS de *Yersinia enterocolitica* O:9 [18]. La structure reconnue par cet anticorps monoclonal reste donc inconnue.

De plus, puisque la chaîne O de *Brucella melitensis* biovar 1 comporte aussi des résidus liés en  $\alpha$ -1,2, pourquoi les anticorps monoclonaux définis comme étant spécifiques de l'épitope A ne reconnaissent pas *Brucella melitensis* biovar 1 dans une



moindre mesure ? L'épitope A semble donc de moins en moins spécifique de *Brucella abortus* biovar 1. Il est possible que l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal 2C8 soit présent sur *Brucella melitensis* biovar 1 en très faible quantité ou soit « tronqué ». Finalement, il est probable que tous les anticorps monoclonaux définis comme spécifiques de l'épitope A ne reconnaissent pas exactement la même structure, et que celle-ci ne soit pas représentée de manière équitable sur la chaîne O de *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* et de *Yersinia enterocolitica* O:9.

#### 1.4.3.3. Épitope C

Bien que sa structure reste inconnue, tout le monde semble d'accord sur l'existence d'un épitope C, spécifique aux *Brucella*. Comme énoncé précédemment, la différence majeure entre les chaînes O des *Brucella* et des *Yersinia enterocolitica* O:9 réside dans l'absence de liaisons  $\alpha$ -1,3 chez ces dernières. L'épitope C devrait donc faire intervenir une liaison  $\alpha$ -1,3.

#### 1.4.4. Utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques pour le typage d'espèces

Bien que les questions au sujet des épitopes de la chaîne O de *Brucella* restent nombreuses, nous pouvons dire que les anticorps décrits dans la littérature peuvent toujours servir à différencier les différentes espèces. Le 2C8 par exemple (décrit comme A spécifique) a une affinité bien plus grande pour *Brucella abortus* biovar 1 que pour *Brucella melitensis* biovar 1. En choisissant un seuil de reconnaissance adéquat, cet anticorps monoclonal pourra discriminer les deux espèces de bactéries.

## 2. Diagnostic et brucellose

### 2.1. Spécificité et sensibilité d'un test diagnostique

Un test diagnostique doit être capable de déterminer correctement la présence ou l'absence d'une maladie. Deux notions sont importantes : la **sensibilité** et la **spécificité**. Elles s'expriment en %. Un test avec une sensibilité de 95 % est un test qui donne un résultat positif chez 95 % des personnes ou animaux effectivement malades. Un test avec une spécificité de 95 % est un test qui donne un résultat négatif chez 95 % des personnes ou animaux qui ne sont pas malades.

La spécificité d'un test est donc liée aux faux positifs. Plus la spécificité est élevée, plus la possibilité d'avoir des faux positifs est écartée. Par ailleurs, plus la sensibilité est élevée, moins il y aura de faux négatifs. Un test spécifique s'utilise pour poser un diagnostic positif, un test sensible s'utilise pour exclure un diagnostic.



Les **valeurs prédictives** d'un test sont également des données importantes lors d'un diagnostic. Les valeurs prédictives positives et négatives expriment la probabilité qu'un examen positif ou négatif corresponde à la réalité.

La **prévalence** d'une maladie est le pourcentage d'individus effectivement malades dans toute la population. Dans une région où la prévalence est grande (beaucoup d'individus atteints), la valeur prédictive positive d'un même test sera plus élevée que dans une région où la prévalence est presque nulle.

Ci-dessous sont repris les résultats possibles d'un test diagnostique.

		Résultat de l'examen		
<i>Maladie</i>	<i>Présente</i>	<i>Positif</i>	<i>Négatif</i>	<i>Total</i>
	<i>Absente</i>	a	b	a + b
		c	d	c + d
<i>Total</i>		a + c	b + d	a + b + c + d

$$\text{Sensibilité} = \frac{a}{a+b}$$

$$\text{Faux négatifs} = b$$

$$\text{Spécificité} = \frac{d}{c+d}$$

$$\text{Faux positifs} = c$$

$$\text{Prévalence réelle de la maladie} = \frac{a+b}{a+b+c+d}$$

Si  $a + b + c + d$  est un échantillon représentatif de la population, alors:

$$\text{Valeur prédictive positive de l'examen} = \frac{a}{a+c}$$

$$\text{Valeur prédictive négative de l'examen} = \frac{b}{b+d}$$

## 2.2. Diagnostic de la brucellose

La lutte contre la brucellose repose sur deux stratégies, la vaccination et le dépistage-diagnostic. Le choix de la stratégie repose sur la prévalence. Actuellement, dans le cas de la Belgique, la stratégie est de type sanitaire. Elle a pour but l'éradication et la surveillance de la maladie. Dans ce cas, la vaccination est exclue et les animaux sérologiquement positifs sont obligatoirement abattus.

Les tests de diagnostic utilisés sont regroupés en deux catégories : les diagnostics directs et les diagnostics indirects. En routine, le diagnostic de la brucellose est basé sur la détection d'anticorps spécifiques du S-LPS.

### 2.2.1. Les diagnostics directs

Ils reposent sur la mise en culture d'échantillons, permettant l'isolement et l'identification des *Brucella*. Cette méthode est longue et implique une manipulation de



Test	Sensibilité	Spécificité	Anticorps détectés
SAT	29,1-100	99,2-100	IgM - IgG2
RBT	21,0-98,3	68,8-100	IgG1
CFT	23,0-97,1	30,6-100	IgM - IgG1
ELISA-I	92,5-100	90,6-100	IgG1 - IgG2

**Tableau 4 :** Sensibilité et spécificité de tests sérologiques utilisés pour le diagnostic de la brucellose ainsi que les isotypes des anticorps détectés. Les valeurs de spécificité et de sensibilité (%) présentées reprennent les valeurs extrêmes obtenues pour ces différents tests. D'après Nielsen *et al.*, 2002.

l'agent pathogène. D'autres techniques comme la PCR peuvent être inclus dans cette catégorie. Depuis 1987, la technique de réaction en chaîne de la polymérase (PCR) est mise à profit pour le diagnostic de la brucellose. Elle permet l'identification du genre de la bactérie (*Brucella*), ainsi que de l'espèce (*abortus*, *melitensis*, etc.) et du biovar. Les problèmes rencontrés ont principalement trait à la préparation des échantillons [24].

## 2.2.2. Les diagnostics indirects

Dans ces tests, ce n'est pas la présence du pathogène lui-même qui est mise en évidence, mais la réponse immunitaire induite suite à une infection. Ces tests tentent de détecter soit la réponse immunitaire humorale, soit la réponse immunitaire cellulaire. Dans le premier cas, la production d'anticorps spécifiques sera « mesurée » (tests sérologiques), dans le deuxième, les cytokines inflammatoires ou la sensibilité à un antigène seront étudiés (intradermoréaction).

### 2.2.2.1. Tests sérologiques

Différents tests ont été développés. Le tableau 4 reprend la spécificité et la sensibilité ainsi que les anticorps détectés de quelques uns des tests suivants [25, 26] :

#### A. Test de séro-agglutination de Wright (SAW)

Ce test détecte les immunoglobulines M (IgM) et les immunoglobulines G2 (IgG2) sériques par l'interaction avec une suspension de *B. abortus*. Il présente une faible spécificité ainsi qu'une faible sensibilité. Cependant, la spécificité peut être améliorée par l'ajout d'EDTA ou de DTT.

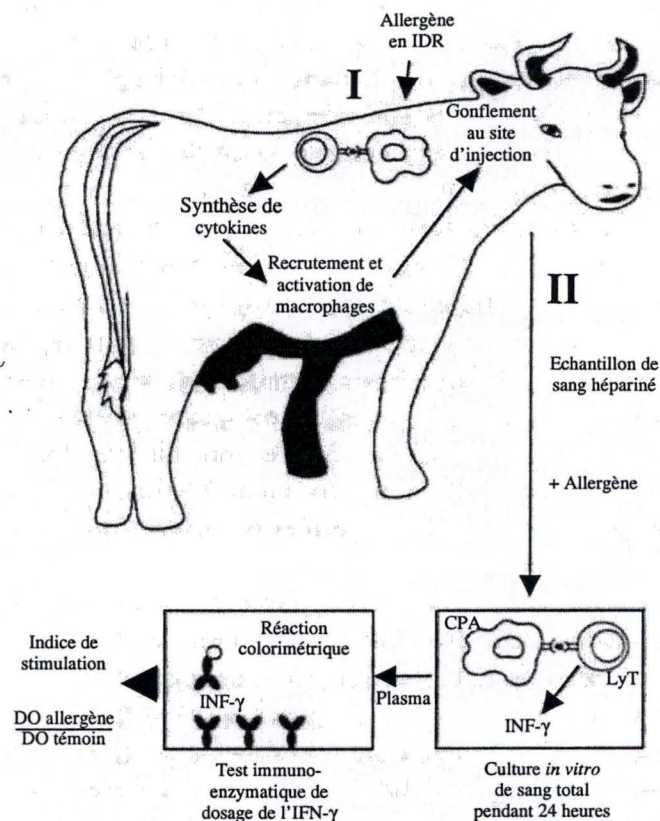
#### B. Test au Rose Bengale (RBT)

À pH acide, l'agglutination des IgG bovines est facilitée alors que celle des IgM est réduite. La spécificité du test d'agglutination est donc augmentée par la réduction des interactions non spécifiques dues aux IgM. L'antigène utilisé est une suspension de *Brucella* colorées au Rose Bengale dans un tampon à pH 3,65. Cette technique est simple, rapide, peu coûteuse mais non automatisable. Elle présente une haute sensibilité, une faible spécificité et est utilisée comme test de criblage. Ce test doit être suivi d'un test de confirmation comme le test de fixation du complément.

#### C. Test de fixation du complément (CFT)

Le complément a la capacité de se fixer sur les complexes immuns formés d'antigènes bactériens (*B. abortus*) et d'anticorps potentiellement présents dans le





**Figure 6 :** Lors d'une intradermoréaction (I), un allergène est injecté dans le derme. Cet allergène est mûré par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) puis reconnu par des lymphocytes T sensibilisés. Le test IFN-γ (II) met en évidence le même type de réponse en mesurant, non pas un épaissement du pli de peau, mais la production d' IFN-γ dans un échantillon de sang complet hépariné. La présence de cette cytokine dans la culture, est ensuite détectée par un ELISA de capture.

sérum. Des érythrocytes sensibilisés<sup>6</sup> sont ajoutés au mélange. Lorsqu'il n'y a pas d'anticorps spécifiques à *Brucella*, le complément se fixe aux érythrocytes et provoque leur lyse. Le degré d'hémolyse est inversement proportionnel à la quantité d'anticorps spécifiques. Ce test est reconnu internationalement comme étant un test de confirmation, car il a une haute spécificité et une faible sensibilité.

#### D. Test de l'anneau (Ring test, RT)

Ce test permet de détecter la présence d'anticorps dirigés contre *Brucella* en ajoutant des bactéries colorées dans le lait. L'agglutination des IgA, IgM et IgG, dans la crème du lait forme un anneau coloré mauve de *Brucella*. Si l'animal est sain, la coloration est uniforme.

#### E. ELISA indirect (I-ELISA)

Cette technique permet la visualisation de la liaison d'un anticorps à son antigène adsorbé au fond d'un puits. Plusieurs variantes ont été décrites. Différents antigènes peuvent être utilisés ; des protéines cytoplasmiques, des OMP (outer membrane proteins), et principalement du S-LPS. L'ELISA indirect peut être utilisé pour tester du sérum ou du lait. Il présente une bonne sensibilité.

#### 2.2.2.2. Intradermoréaction

Lors d'une infection par *Brucella*, l'hôte infecté développe également une réponse immunitaire de type cellulaire. Celle-ci peut être mise en évidence par une réaction d'hypersensibilité retardée suite à l'injection dans le derme d'antigènes de *Brucella* (le Brucellèrgène® par exemple). Si l'animal a déjà été en contact avec le microorganisme, une réaction inflammatoire localisée à l'endroit de l'injection apparaît endéans les 48 à 72 heures (Figure 6). Ce test a une spécificité proche de 100 % et une sensibilité de 70-80 %. Il demande cependant une double manipulation de l'animal et présente un risque de modification du statut immunitaire de l'animal.

#### 2.2.2.3. Test à l'interféron gamma

Ce test met en évidence le même type de réponse que lors de l'intradermoréaction. Il mesure la production d'IFN- $\gamma$  dans un échantillon de sang. Cet échantillon est mis en contact avec l'allergène et le tout est mis en culture. La présence d'IFN- $\gamma$  est mise en évidence par un ELISA de capture<sup>7</sup> (figure 6) [27].

<sup>6</sup> Érythrocytes sur lesquels sont fixés des anticorps par leurs parties variables, formant ainsi des complexes antigènes-anticorps.

<sup>7</sup> ELISA de capture : un anticorps spécifique de l'IFN- $\gamma$  est adsorbé au fond d'un puit. Le plasma est ensuite incubé. Après lavage, la présence d'IFN- $\gamma$  est mise en évidence par un autre anticorps spécifique.



## 2.3. Problèmes liés au diagnostic

La vaccination des troupeaux se fait avec des souches de *Brucella* atténuées. Les souches vaccinales efficaces portent un LPS lisse au même titre que les souches virulentes. Dans les deux cas, l'individu infecté ou vacciné développe une réponse immunitaire induisant la production d'anticorps dirigés contre le S-LPS. Comme la détection des anticorps spécifiques du S-LPS est utilisée dans la plupart des tests diagnostique de routine, ils ne permettent pas de faire la distinction entre les animaux vaccinés et les animaux infectés [28].

De nombreux cas de **faux positifs** sont apparus lors de tests sérologiques utilisés en routine [29-32]. Ces animaux diagnostiqués positifs ne présentaient aucune manifestation clinique de la brucellose et un diagnostic bactériologique négatif. Une caractéristique commune à ces réactions sérologiques faussement positives (RSFPs) est la décroissance anormalement rapide de la réponse sérologique.

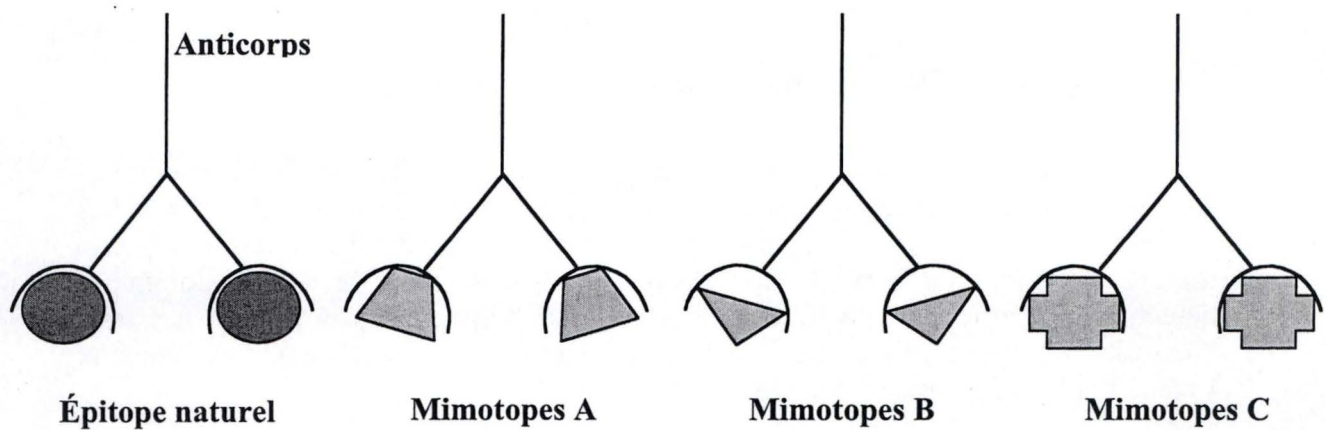
L'**origine** de ces réactions sérologiques faussement positives se trouve dans la cross-réactivité entre les souches lisses de *Brucella* et d'autres bactéries à Gram négatif (*Yersinia enterocolitica* O:9, *Salmonella urbana*, *Vibrio cholerae* et *Escherichia coli* O:157), *Yersinia enterocolitica* O:9 étant la source la plus courante de confusion car la chaîne O du S-LPS de cette bactérie est presque la même que celle de *Brucella abortus* [19].

Des analyses bactériologiques permettent de détecter la présence de *Yersinia enterocolitica* O:9 dans les matières fécales, ces méthodes sont cependant fastidieuses, longues et inacceptables au niveau économique à grande échelle.

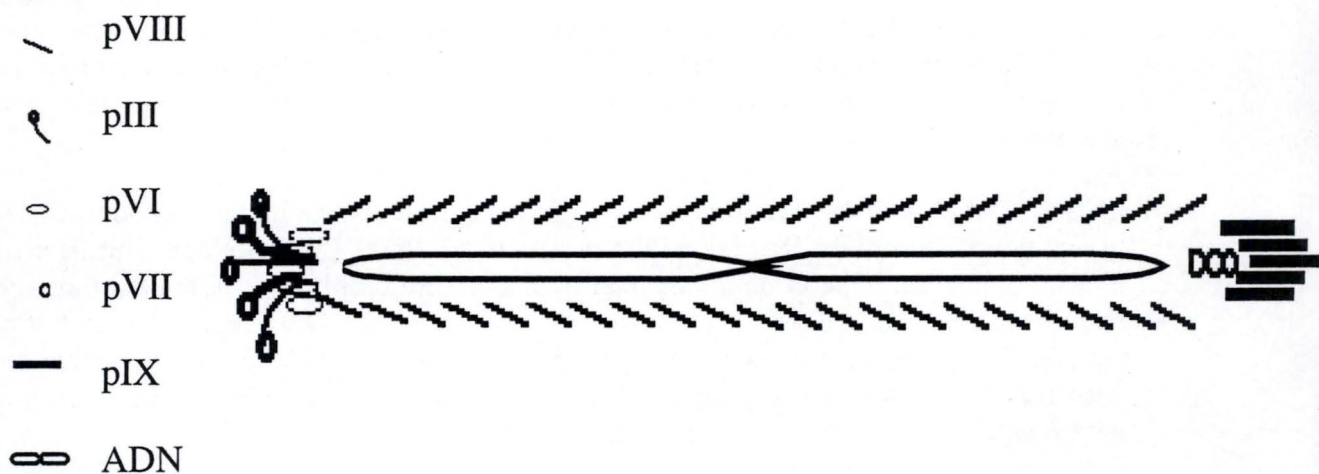
Différents tests sérologiques ont été mis au point afin de discriminer les pathogènes, mais malheureusement, la sensibilité et la spécificité de ces tests font souvent défaut.

L'**ELISA-YOPs** (*Yersinia* outer membrane proteins) est un test qui pourrait être utilisé pour discriminer les réactions faussement positives [29]. Il s'agit d'utiliser les YOPs comme antigène et de les incuber avec des séras d'animaux, permettant ainsi la mise en évidence d'une infection par *Yersinia enterocolitica* O:9. Cependant, ce test ne peut être utilisé seul pour résoudre le problème. De fait, ce test doit être suivi d'un test spécifique de la brucellose, car la probabilité d'une double infection par *Yersinia enterocolitica* O:9 et *Brucella* ne peut être écartée.

Weynants et ses collaborateurs ont démontré une spécificité de 100 % pour un test sur 40 individus soupçonnés de RSFPs [27]. Ce test mesure, après la mise en présence de l'allergène, la production d'**interféron gamma** (IFN- $\gamma$ ) dans le sang par l'intermédiaire d'un test ELISA de capture (Figure 6). Cette cytokine est produite par les lymphocytes T spécifiques et joue un rôle clé dans la réponse immunitaire. La totalité des animaux (40) étaient diagnostiqués négatifs pour le test IFN- $\gamma$  alors qu'ils étaient positifs pour certains des tests sérologiques classiques. Cependant, certains animaux expérimentalement infectés par *Yersinia enterocolitica* O:9 ont été diagnostiqués positifs avec ce test [31]. Une des raisons avancée pour laquelle la production d'IFN- $\gamma$  est stimulée chez ces animaux expérimentalement infectés se



**Figure 7: Mimotopes.** Un mimotope est une molécule capable d'interagir avec l'anticorps qui reconnaît l'épitope naturel. Les mimotopes sont donc des mimes moléculaires de cet épitope. Les différents mimotopes et l'épitope naturel n'interagissent pas de la même manière avec l'anticorps.



**Figure 8: Représentation schématique d'un phage filamenteux.**



trouverait dans les préparations de Brucellergène®. La possibilité d'une présence de S-LPS ou les protéines de *Brucella* pourraient induire la synthèse d'INF- $\gamma$ .

Les bactéries du genre *Brucella* et *Yersinia enterocolitica* O:9 ont des **épitopes** en communs. D'autres sont **spécifiques** du genre *Brucella*. Kittelberger et ses collaborateurs ont examiné la possibilité d'utiliser ces différences au profit d'un test de diagnostic discriminatoire [30]. Les épitopes C sont présents sur des souches de *Brucella* et ne sont pas présents chez *Yersinia enterocolitica* O:9. L'isolement de cet épitope permettrait son utilisation dans un test de diagnostic. Cependant, les difficultés de synthèse des composants de base de la chaîne O rendent irréaliste la production d'épitopes spécifiques. Leur purification à partir de S-LPS est elle aussi irréaliste car non applicable à l'échelle industrielle. Finalement, le plus grand obstacle à l'utilisation de l'épitope C réside dans le fait que sa structure reste inconnue.

Un bonne solution semble être l'utilisation de **mimotopes d'épitopes spécifiques de la chaîne O de *Brucella***.

### 3. Mimotopes et diagnostic

#### 3.1. Mimotopes

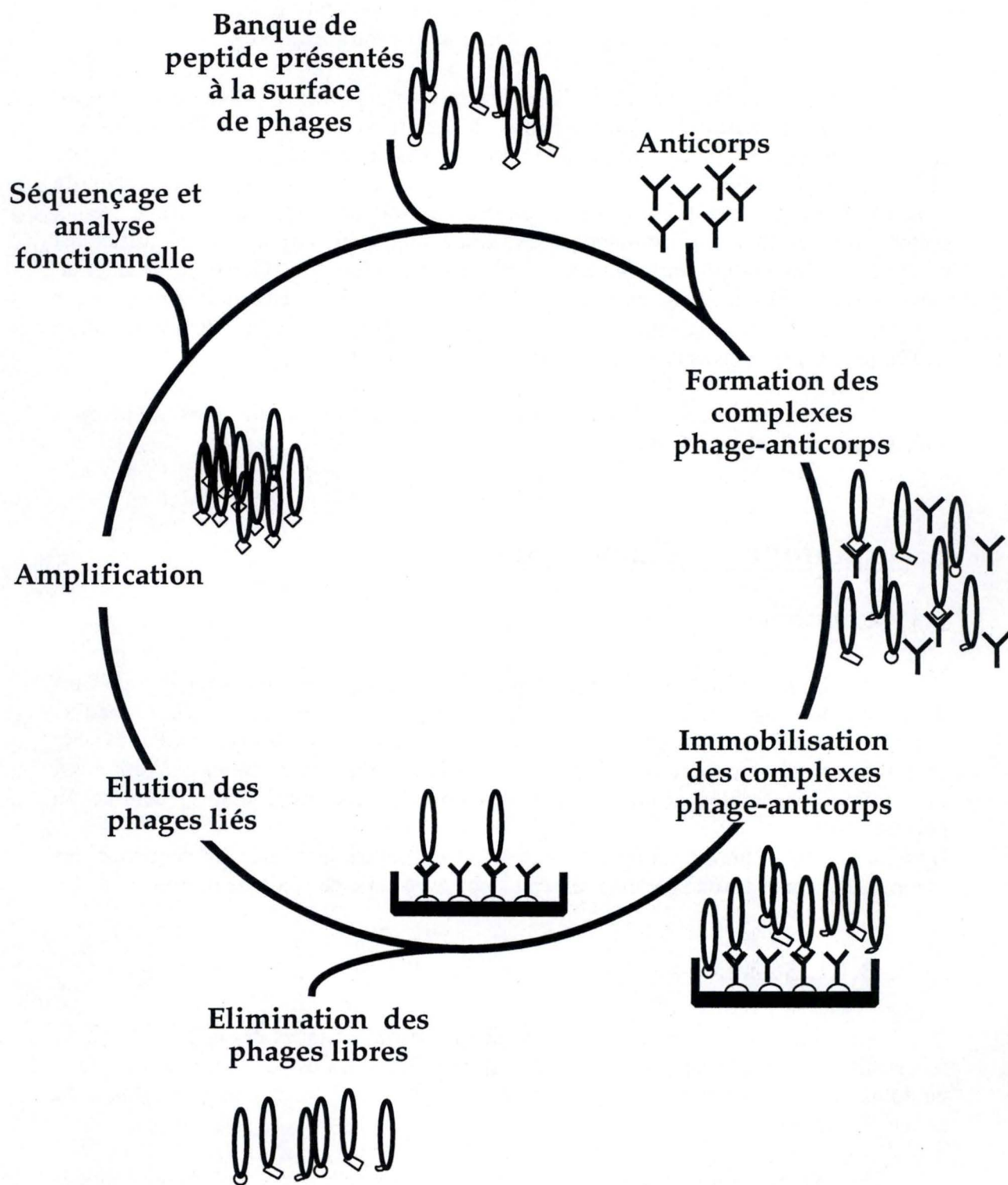
Au départ, un mimotope était défini comme un peptide mimant un épitope dans sa capacité à se lier à un anticorps [33]. Un mimotope est donc une molécule capable d'interagir avec l'anticorps qui reconnaît l'épitope mimé (Figure 7) [34, 35]. Par la suite du travail, nous ne parlerons que des mimotopes peptidiques. Ceux-ci peuvent aussi bien mimer des cibles protéiques que des cibles d'une autre nature, comme un polysaccharide.

Dans le cas où l'épitope mimé est linéaire, et de nature protéique, la séquence des mimotopes peut avoir une certaine ressemblance avec celle de l'épitope mimé.

##### 3.1.1. Sélection

La sélection de mimotopes peut se faire à partir de banques de peptides présentés à la surface de phage filamenteux (phage display) [36, 37]. Les peptides sont fusionnés au domaine amino-terminal des protéines pIII ou pVIII qui constituent l'enveloppe du phage (Figure 8).

Les phages recombinants sont sélectionnés pour la capacité qu'ont les peptides présentés à se lier à différents anticorps monoclonaux ou à des anticorps de sera. Après de nombreux lavages, les phages fixés sont élués puis isolés et amplifiés par infection et culture de leur hôte (*E. coli*). Les phages amplifiés peuvent alors être réintroduits dans un nouveau cycle de sélection avec la cible. Après quelques cycles de sélection-amplification, les phages portant des peptides mimotopes seront surreprésentés. Ils seront isolés, séquencés et caractérisés pour leur liaison à l'anticorps monoclonal ou aux anticorps du sérum (Figure 9).



**Figure 9:** Sélection et amplification de phages. Les anticorps sont mis en présence de la banque de peptides présentés à la surface de phages. Les complexes antigènes-anticorps sont ensuite immobilisés sur un support. Les phages non liés sont éliminés par la suite lors de lavages. Les phages portant des peptides ayant une affinité pour les anticorps sont élués et amplifiés par infection de *E.coli*. Ce cycle est répété afin d'augmenter la proportion des phages portant des peptides mimotopes. Ceux-ci peuvent alors être séquencés et caractérisés pour leur affinité aux anticorps ayant servi à la sélection.



Une sélection avec un anticorps monoclonal peut aboutir à l'obtention de plusieurs mimotopes, ceux-ci ne montrant aucune relation au niveau de leurs séquences. Parmi les différents mimotopes sélectionnés avec un même anticorps monoclonal, certains peuvent ou non interagir avec l'anticorps de la même manière que l'épitope. Dans le cas où la molécule mimée n'est pas de nature protéique, les interactions de l'épitope avec l'anticorps ne seront jamais reproduites avec les mimotopes.

### 3.1.2. Intérêts

Les mimotopes sont intéressants à plusieurs titres.

La découverte de mimotopes peut informer sur **l'origine d'une protéine immunogène**. L'exemple de l'arthrite rhumatoïde (RA) est présenté ci-dessous [38]. L'étude de la séquence primaire ne peut cependant détecter qu'une identité avec un épitope linéaire. Les épitopes conformationnels ne peuvent pas être mis en évidence de cette manière. De même, les épitopes non protéiques ne pourront jamais être mis en évidence par cette méthode.

L'arthrite rhumatoïde est une maladie autoimmune caractérisée par une inflammation chronique des membranes qui joignent les articulations, les membranes synoviales. L'identité des antigènes responsables de la prolifération des lymphocytes B dans la synovie est inconnue et difficile à investiguer. L'utilisation de banque de peptides sur phage a été mise en œuvre afin de contribuer à leur identification. Des sera de patients présentant des symptômes de RA ainsi que des sera de patients sains ont servi à sélectionner des peptides. Une première sélection a été réalisée avec les sera des patients atteints, les peptides sélectionnés ont ensuite été étudiés pour leur réactivité vis-à-vis des sera positifs et négatifs. Le résultat révèle trois peptides communs aux sera positifs et non reconnus par les sera négatifs. Afin d'identifier l'antigène et la cible autoimmune, une recherche dans les bases de données de séquences a été effectuée. Elle a permis de mettre en évidence quatre antigènes et une cible potentiels.

Un des peptides présentait une certaine similarité avec la séquence d'un épitope présent sur une protéine de surface majoritaire du virus de l'Herpes et du virus de la varicelle. Un autre peptide indiquait une similarité avec l'antigène nucléaire de l'EBV (Epstein-Barr virus) et une protéine de la nucléocapside du virus parainfluenza. Ce même peptide présentait également une ressemblance de séquence avec la cible autoimmune potentielle, le précurseur de la chaîne alpha du collagène.

De plus, l'obtention de mimotopes n'exige pas de connaître la **structure exacte de l'antigène** à mimer.

Dans une **optique vaccinale**, les mimotopes peuvent mimer le domaine antigénique de molécules induisant une réponse immunitaire T-indépendante<sup>8</sup> comme le LPS ou la plupart des polysaccharides. De par sa nature peptidique, un mimotope déclenche une réponse immunitaire T-dépendante et induit la formation de lymphocytes B mémoires permettant une protection à long terme [35]. De plus, pour immuniser, les

<sup>8</sup> Molécule T-indépendante : molécule qui conduit uniquement à une réponse IgM.



molécules doivent être couplées à un carrier<sup>9</sup>. Dans le cas de peptides mimotopes, le couplage se réalise facilement, par exemple par fusion transcriptionnelle. Le LPS est quant à lui plus difficile à coupler. Sa purification et sa détoxification sont également difficiles.

Les mimotopes sont également intéressants dans une approche diagnostique.

### 3.2. Mimotopes diagnostiques

De par leur capacité à mimer des épitopes, les mimotopes sont capables de remplacer un antigène naturel dans un test de diagnostic [39] (Voir point 3.2.3. pour des exemples).

La production d'anticorps induite lors de la réponse immunitaire n'est pas homogène sur l'ensemble du ou des antigènes la déclenchant (bactéries, virus, vaccins sous-unitaires<sup>10</sup>, cellules tumorales, autoantigènes, etc.). Certaines parties d'un antigène ne provoquent jamais la production d'anticorps tandis que d'autres en induisent un grand nombre (épitopes fortement immunogènes ou immunodominants). L'utilisation de mimotopes dans un test diagnostique nécessite évidemment que l'épitope mimé soit particulièrement immunogène. Un bon mimotope doit donc être le **mime de la partie antigénique immunodominante**.

Lorsque les mimotopes sont utilisés comme antigènes dans un test diagnostique (par exemple dans un test ELISA), le bruit de fond est théoriquement plus faible qu'avec un extrait brut de bactéries ou des protéines recombinantes. Ces dernières possèdent une série d'autres épitopes que ceux que l'on veut détecter. Nous pouvons dire que l'information antigénique nécessaire à un test diagnostique se trouve « concentrée » et « isolée » quand des mimotopes de domaines antigéniques immunodominants sont utilisés.

Les peptides mimotopes utilisés dans une optique diagnostique peuvent être divisés en deux catégories suivant la méthode ayant servi à leur sélection. D'un côté, on retrouve des mimotopes sélectionnés avec des **anticorps monoclonaux**, de l'autre, des mimotopes sélectionnés avec des **séras spécifiques** d'individus malades ou immunisés.

#### 3.2.1. Mimotopes sélectionnés avec des anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux ne représentent pas l'ensemble des anticorps induits, donc il faut utiliser des anticorps monoclonaux reconnaissant un épitope immunodominant. L'utilisation de plusieurs anticorps monoclonaux reconnaissant différents épitopes de l'antigène naturel devrait augmenter la sensibilité dans le cas où ces antigènes n'induisent pas toujours la même population d'anticorps chez tous les individus. La spécificité des tests diagnostiques peut également être augmentée en

<sup>9</sup> Les petites molécules ne sont pas immunogènes par elles-mêmes ou très peu. Pour les rendre immunogènes, elles sont couplées à une protéine immunogène, un carrier.

<sup>10</sup> Vaccin sous-unitaire : vaccin composé de quelques protéines de l'agent pathogène, protéines produites par génie génétique ou d'ADN nu.



utilisant plusieurs mimotopes mimant des épitopes spécifiques. Dans le cas du diagnostic de la tuberculose, le rassemblement de différents épitopes spécifiques a permis d'augmenter la sensibilité de la détection des anticorps spécifiques de *Mycobacterium tuberculosis* [40]. Les différents épitopes étaient fusionnés génétiquement en une polyprotéine. Elle reprenait la séquence de quatre antigènes sélectionnés à partir de banque d'expression d'ADN génomique de *Mycobacterium tuberculosis*.

### 3.2.2. Mimotopes sélectionnés avec des sera

Les anticorps d'individus infectés, immunisés ou souffrant d'une maladie autoimmune reflètent la réponse immunitaire humorale contre l'entièreté des antigènes et principalement contre les domaines antigéniques immunodominants. Des mimotopes peuvent être sélectionnés avec le **sérum** de ces individus. Il en résulte alors une série de mimotopes, incluant les mimes spécifiques de la ou les molécules responsables de la production d'anticorps. Afin d'obtenir ensuite des mimotopes spécifiques de la maladie, ils sont étudiés pour leur réactivité vis-à-vis de sera d'individus atteints et d'individus sains. Un peptide mimotope spécifique sera reconnu par un maximum de sera positifs et pas par les sera négatifs.

Cette méthode implique des procédures applicables à des maladies pour lesquelles aucune molécule immunodominante n'a encore été mise en évidence.

Si le pathogène présente une **variation** dans l'expression des molécules antigéniques, les individus nouvellement atteints ne seront pas détectés avec les mimotopes. Il faut alors resélectionner des mimotopes avec ces nouveaux sera.

Cependant, la **complexité** de la composition du sérum impose l'utilisation d'un grand nombre de sera positifs et négatifs afin d'obtenir un mimotope spécifique, reconnu par un maximum de sera positifs et non par les sera négatifs.

### 3.2.3. Exemples

#### 3.2.3.1. Mimotopes spécifiques de virus : *Papillomavirus humain (HPV)* [41]

Trois banques de peptides ont été criblées par des sera de patients infectés par le HPV afin de caractériser la spécificité des anticorps présents chez les patients et d'identifier des mimotopes. 141 phages sont sortis des sélections successives. Ils ont été analysés en ELISA avec 36 sera de patients infectés par un HPV et 24 sera de personnes non infectées. 44 % des individus positifs pour le HPV réagissaient avec au moins un peptide. Seuls deux sera négatifs pour le HPV sur les vingt-quatre étaient positifs avec un peptide. Une combinaison de mimotopes spécifiques dans un test diagnostique permettrait la détection précoce d'une infection par un HPV, diminuant ainsi les risques du cancer du col de l'utérus.

**3.2.3.2. *Mimotopes spécifiques de bactéries pathogènes : le cas de *Borrelia burgdorferi*, agent responsable de la maladie de Lyme [42]***

Des anticorps provenant de sera de patients atteints de la maladie de Lyme ont été utilisés afin de sélectionner des mimotopes à partir de banques de peptides présentés sur phages. Les candidats ainsi sélectionnés ont ensuite été passés en revue pour leur réactivité vis-à-vis de sera positifs et négatifs pour la maladie de Lyme. Dix-sept peptides réagissaient avec au moins trois sera positifs, aucun sera provenant d'individus sains ne démontraient de réactivité pour ces mêmes peptides. Ceux-ci semblent donc être de bons candidats pour un test diagnostique de la maladie de Lyme.



## 4. Données préliminaires et objectif du travail

Un des problèmes liés au diagnostic de la brucellose réside dans la **parenté antigénique** de *Brucella* avec *Yersinia enterocolitica* O:9. L'utilisation de **mimotopes sélectionnés par des anticorps monoclonaux spécifiques de la chaîne O de *Brucella*** peut être mise au profit d'un test diagnostique spécifique de la brucellose.

Notre travail aura pour but de caractériser la reconnaissance de ces mimotopes par des sera d'animaux **infectés expérimentalement** par *Brucella*.

Les mimotopes utilisés ont été sélectionnés par trois anticorps monoclonaux : le **6B3<sup>11</sup>**, le **2C8<sup>12</sup>** et le **12B12<sup>13</sup>** [18]. Ces anticorps ont été définis comme reconnaissant trois épitopes spécifiques de la chaîne O du LPS de *Brucella*, l'épitope M, l'épitope A et l'épitope C respectivement.

Pour chaque anticorps monoclonal, nous avons choisi deux ou trois mimotopes. *A priori* pour l'anticorps monoclonal 12B12, les peptides 7a<sup>14</sup> et 33c<sup>15</sup> semblent être les meilleurs candidats. Ces peptides étaient bien reconnus lorsqu'ils étaient testés en ELISA avec des sera de souris infectées avec *Brucella* ou immunisées avec le LPS. Pour les anticorps monoclonaux 2C8 et 6B3, nous choisissons sans *a priori* un mimotope de chaque consensus mis en évidence lors des étapes de sélection [23, 43]. Les mimotopes choisis sont surlignés en gris.

### Les "consensus 6B3"

6B3(3), (7), **(12)** :

DTKM **C** GQIP **C** HPST  
DKRM **C** GLAP **C** MPSF  
**ANKM C GTVP C HPRV**

Consensus : XXXM **C** GXXP **C** XPXX

6B3(8), **(9)**, (10) :

PQQH **C** APLKE **C** ELSP  
**SDQR C SPLKI C TTVG**  
LNQS **C** APLRE **C** ALHL

Consensus : XXQX **C** XPLXX **C** XXXX

<sup>11</sup> Nom complet : A15-6B3

<sup>12</sup> Nom complet : B66-2C8

<sup>13</sup> Nom complet : A76-12B12

<sup>14</sup> Séquence du mimotope 7a : DRFGNYRTQ

<sup>15</sup> Séquence du mimotope 33c : TTYGDYVRT

6B3(2),(4), (5), (6), (11) :

```
APTQ C SQTWP C PSHL
PPPQ C SKAWP C PPTH
PFPQ C TPPHD C PAPV
GPGQ C NTRNP C PRPM
APAQ C SAAMP C PLPL
```

Consensus : xxxQ C xxxxx C pxxx

### Les "consensus 2C8"

2C8(3), (11), (12), (13) :

```
ESKHS C QIW C DNML
TONES C MIW C DTVY
LVDRR C YIW C DGPE
GISEP C LIW C DGNA
```

Consensus : xxxxx C XIW C dxxx

2C8(1), (14) :

```
YGPW C DDTPQA C RSWE
EYPW C DAPNTA C AEPQ
```

Consensus : xppw C dxxxxa C xxxx

Le mimotope 2C8(7)<sup>16</sup> n'appartient à aucun consensus, mais des données préliminaires indiquent qu'il serait capable d'induire des anticorps cross-réactifs avec le LPS dans un modèle murin.

Les sera utilisés pour tester les mimotopes sont obtenus par infection de souris BALB/c avec différentes **souches représentatives de *Brucella*** ainsi que *Yersinia enterocolitica* O:9 comme contrôle de spécificité.

Les souches de *Brucella* choisies sont :

- *Brucella abortus* 544, souche A dominante
- *Brucella melitensis* 16M, souche M dominante
- *Brucella abortus* biovar 9, souche M dominante

Les souches de *Brucella abortus* 544 et *Brucella melitensis* 16M sont représentatives des sérotypes A<sup>+</sup>M<sup>-</sup> et A<sup>-</sup>M<sup>+</sup> respectivement. Nous avons également choisi *Brucella abortus* biovar 9 car elle n'est pas reconnue de la même manière que les autres souches représentatives du sérotype A<sup>-</sup>M<sup>+</sup> par nos trois anticorps monoclonaux (Annexe 1).

<sup>16</sup> Séquence du mimotope 2C8(7) : CHHSPEEYDPC



# **RESULTATS ET DISCUSSION**

## Résultats et discussion

### 1. Infection de souris

Nous avons vérifié la présence du plasmide de virulence (pYV) chez *Yersinia enterocolitica* O:9 par un test au Rouge Congo (MOX-RC) (voir Matériel et Méthodes 1.1.1). Le plasmide pYV était bien présent dans la souche de *Yersinia enterocolitica* O:9 qui nous a servi à réaliser les infections.

Nous avons réalisé les infections de souris BALB/c âgées de sept semaines avec  $5.10^5$  bactéries des différentes souches. Le tableau suivant reprend les souches bactériennes injectées, le nombre de souris utilisées, la voie d'entrée et la vérification de la dose infectante.

Souches	Nombre de souris	Voie d'entrée	Volume	Vérification de la dose infectante
<i>Brucella abortus</i> 544	8	IP	100 µl	$3,6 \cdot 10^5$
<i>Brucella abortus</i> BV9	8	IP	100 µl	$1,98 \cdot 10^5$
<i>Brucella melitensis</i> 16M	8	IP	100 µl	$1,12 \cdot 10^5$
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	4	IP	100 µl	$3,1 \cdot 10^5$
PBS	4	IP	100 µl	/

IP : intrapéritonéal

La dose infectante correspond à la quantité de bactéries qui doit être injectée pour notre infection expérimentale. Elle est calculée sur base de la densité optique à 600 nm de la solution de bactéries. Elle est ensuite vérifiée en étalant sur milieu de culture des dilutions d'une fraction de cette solution et en y dénombrant les bactéries (CFU ou Colony Forming Units). Dans chacune de nos infections expérimentales, le nombre de bactéries compté sur boîte est très proche de la dose infectante estimée par la mesure de DO.

Remarque : Deux souris infectées par *Brucella abortus* 544 sont mortes après cinq semaines d'infection. De plus, toutes ces souris présentaient des symptômes qui ne sont généralement pas associés à une infection par *Brucella abortus* 544 tel qu'une perte de poids importante et une perte de poils.



## 2. Test des différents sera sur bactéries entières et sur le S-LPS de *Brucella* et *Yersinia enterocolitica* O:9

Afin de déterminer si des anticorps dirigés contre la bactérie et son LPS ont été produits lors de l'infection, nous avons testé les sera prélevés cinq semaines après les différentes infections (Saignée 2, S2) ainsi que les sera pré immuns (S0) sur les bactéries tuées et sur le LPS purifié.

Pour ces tests, nous avons regroupé les sera des souris infectées par une même bactérie ainsi que les sera des souris qui ont reçu du PBS seul.

Nous avons réalisé deux ELISA indirects avec ces dix pools de sera (Bm 16M S0 et S2, Ba BV9 S0 et S2, Ba 544 S0 et S2, YO:9 S0 et S2 et PBS S0 et S2). Le premier avec les bactéries tuées à la chaleur (HK Ba 544, HK Bm 16M, HK Ba BV9 et HK YO:9) et le second avec différents LPS : le LPS W99<sup>17</sup> (A dominant), le LPS de *Brucella melitensis* 16M (M dominant) et le LPS de *Yersinia enterocolitica* O:9.

Le tableau suivant reprend les concentrations de LPS et de bactéries utilisées ainsi que les dilutions auxquels ont été utilisés les sera dans les ELISA indirects.

	LPS Bm 16M	LPS W99	LPS YO:9
LPS (µg/ml)	1	1	1
Bactéries (/ml)	$5.10^7$	$5.10^7$	$5.10^7$
Dilution sera	2000, 6000 et 18000	2000, 6000 et 18000	2000, 6000 et 18000

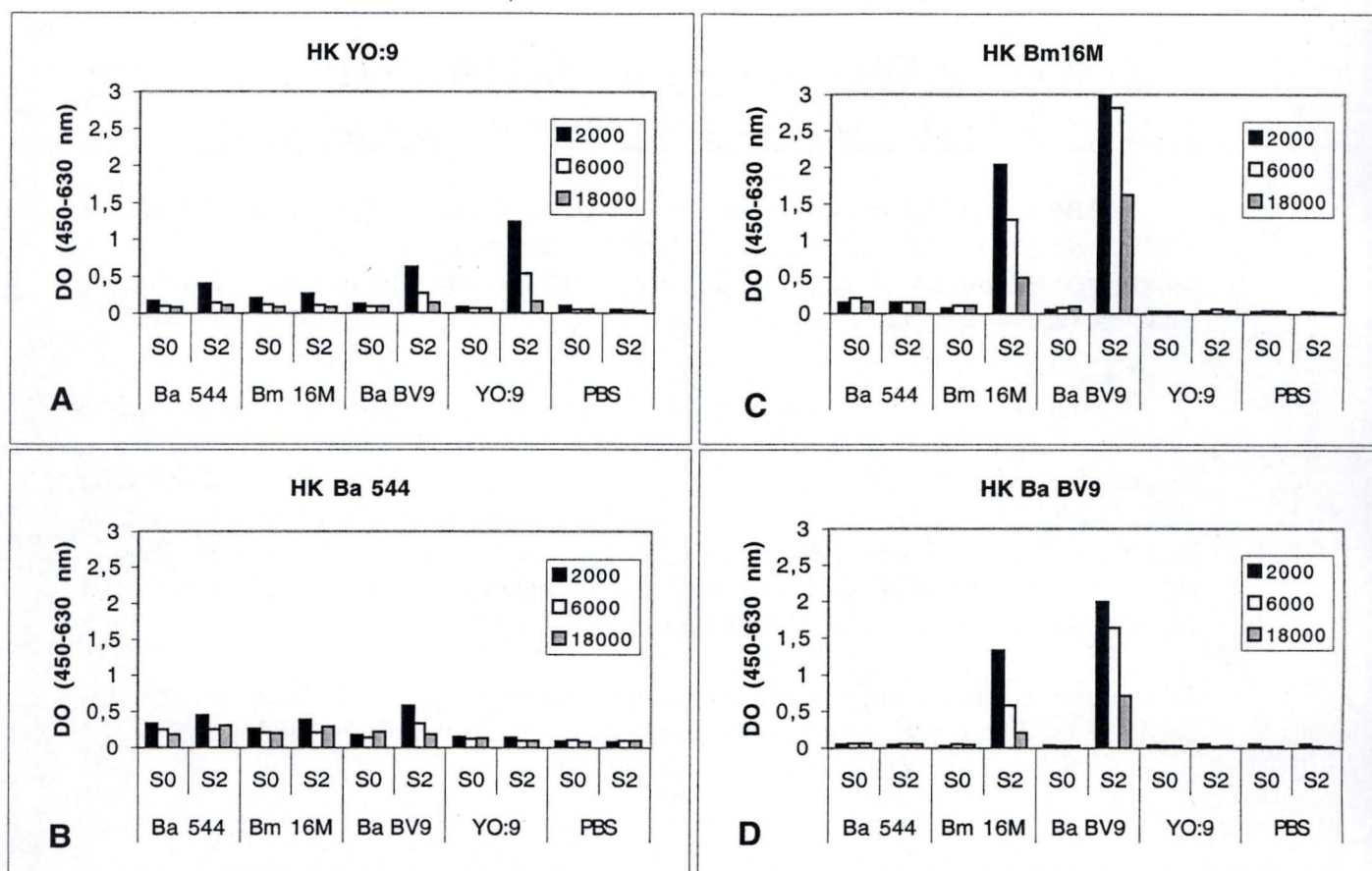
Remarque : Les différentes dilutions de sera indiquées tiennent compte du glycérol ajouté pour leur conservation. Pratiquement, nous avons dilué 1000 X le mélange sérum-glycérol (50/50), ce qui correspond à une dilution effective du sérum de 2000 X. Par la suite, nous utiliserons toujours la dilution réelle des sera.

### 2.1. ELISA sur les bactéries

#### 2.1.1. *Yersinia enterocolitica* O:9

Les sera de souris infectées par *Brucella abortus* biovar 9 montrent une faible réactivité après cinq semaines d'infection (S2) sur les bactéries *Yersinia enterocolitica* O:9 tuées (Figure 10.A). Rappelons que les souches de *Brucella* ont des épitopes communs avec *Yersinia enterocolitica* O:9 (C/Y), ce qui explique les réactions croisées des *Yersinia enterocolitica* O:9 avec les sera de souris infectées par les souches M dominantes. Les sera des souris infectées par *Brucella melitensis* 16M ne montrent cependant pas de réactions croisées à ces dilutions.

<sup>17</sup> Souche W99 : souche de *Brucella abortus* biovar 1 (A dominante) comme *Brucella abortus* 544.



**Figure 10:** ELISA indirect sur les bactéries tuées. A. *Yersinia enterocolitica* O:9 (HK pour heat killed). B. *Brucella abortus* 544. C. *Brucella melitensis* 16M. D. *Brucella abortus* biovar 9. Les dilutions (2000, 6000 et 18000) de chaque sera sont représentées en abscisse. Les sera testés sont des pools de saignées de souris infectées par une même bactérie ou ayant reçu du PBS. Pour chacun de ces groupes d'infection, les sera préimmuns (S0) et les sera prélevés cinq semaines après l'infection (S2) ont été testés. La densité optique (450-630 nm) est présentée en abscisse.



De manière étonnante, les sera des souris infectées par *Brucella abortus* 544 donnent un signal faible après cinq semaines d'infection (S2) proche de celui obtenu avec les sera des souris infectées par les souches M dominantes (Figure 10.A). La chaîne O de *Yersinia enterocolitica* O:9 étant plus proche de celle de *Brucella abortus* 544 que des souches M dominantes, nous nous attendions à ce que la cross-réactivité avec *Brucella abortus* 544 soit plus importante.

Les sera des souris infectées par *Yersinia enterocolitica* O:9 ont la réactivité la plus élevée sur les *Yersinia enterocolitica* O:9 tuées (Figure 10.A). Cependant, après cinq semaines d'infection, nous devions avoir une plus grande réactivité.

Il semble que les infections avec *Brucella abortus* 544 et *Yersinia enterocolitica* O:9 n'aient pas donné de sera très réactifs.

### 2.1.2. *Brucella abortus* 544

Les sera des souris infectées par les deux souches M dominantes (*Brucella melitensis* 16M et *Brucella abortus* biovar 9) montrent une faible réactivité après cinq semaines d'infection due à des réactions croisées (Figure 10.B). Ces réactions croisées sont expliquées par la présence d'épitopes communs (C et C/Y).

De nouveau, les sera de souris infectées par *Brucella abortus* 544 ne montrent qu'une réactivité très faible (Figure 10.B).

Les sera de souris infectées par *Yersinia enterocolitica* O:9 ne montrent aucune différence par rapport au bruit de fond (Figure 10.B). Les chaînes O de *Yersinia enterocolitica* O:9 et de *Brucella abortus* 544 étant proches, nous nous attendions à avoir un signal plus élevé des sera de souris infectées par *Yersinia enterocolitica* O:9.

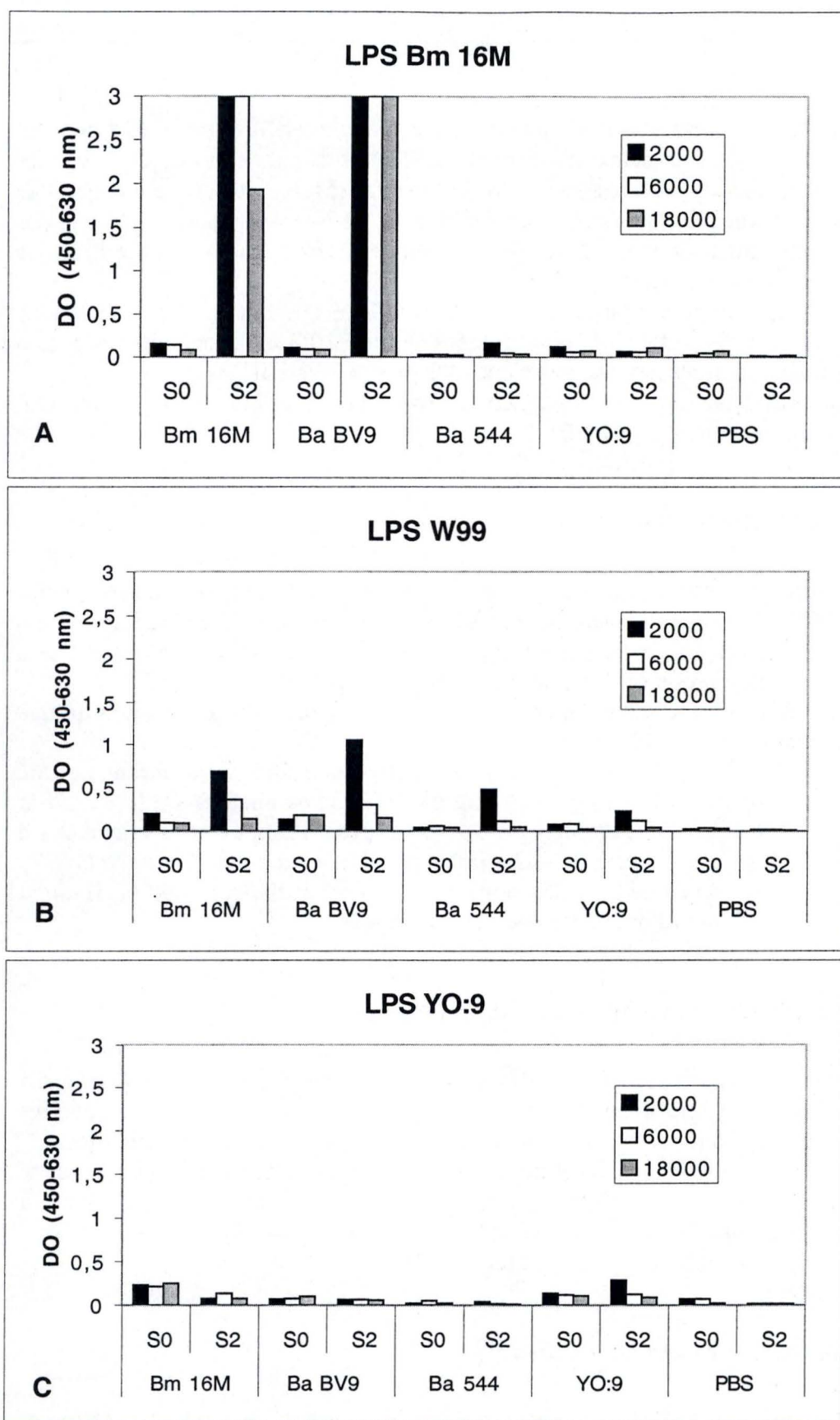
Ces données confirment que les infections avec *Brucella abortus* 544 et *Yersinia enterocolitica* O:9 n'ont pas donné les résultats escomptés.

### 2.1.3. *Brucella melitensis* 16M

Les sera des souris infectées par *Brucella melitensis* 16M et *Brucella abortus* biovar 9 démontrent une forte réactivité après cinq semaines d'infection pour les *Brucella melitensis* 16M tuées à la chaleur (Figure 10.C). *Brucella abortus* biovar 9 étant une souche M dominante, il est normal que des sera de souris infectées par cette même bactérie aient une forte réactivité pour une autre souche M dominante. Les sera de souris infectées par *Yersinia enterocolitica* O:9 et *Brucella abortus* 544 montrent une réactivité proche du bruit de fond (Figure 10.C).

### 2.1.4. *Brucella abortus* biovar 9

Les résultats sont similaires à ceux obtenus sur *Brucella melitensis* 16M (point 2.1.3). Les sera des souris infectées par les deux souches M dominantes et prélevés cinq semaines après l'infection (*Brucella melitensis* 16M et *Brucella abortus* biovar 9) montrent une forte réactivité (Figure 10.D). Les sera des souris infectées par *Yersinia enterocolitica* O:9 et *Brucella abortus* 544 présentent une réactivité proche du bruit de fond. Puisque ces sera (B.ab 544 et Y O:9 dans la figure 10.D) sont très peu réactifs sur



**Figure 11:** ELISA indirect sur les LPS. A. LPS de *Brucella melitensis* 16M. B. LPS W99, A dominant. C. LPS de *Yersinia enterocolitica* O:9. Les dilutions de sera (2000, 6000 et 18000) sont présentes en abscisse. Les sera testés sont des pools de saignées des souris infectées par une même bactérie ou ayant reçu du PBS. Pour chaque groupe d'infection, les sera préimmuns (S0) et les sera prélevés cinq semaines après l'infection (S2) ont été testés. La densité optique à 450-630 nm est présentée en ordonnée.



les *Yersinia enterocolitica* O:9 et la souche A dominante, nous ne nous attendions donc pas à observer une cross-réactivité de ces différents sera résultant de la présence de l'épitope C/Y.

## 2.2. ELISA sur les différents LPS

### 2.2.1. LPS de *Brucella melitensis* 16M (M dominant)

Les signaux obtenus avec les sera préimmuns (S0) correspondent au bruit de fond des sera. Certains anticorps du sera reconnaissent de façon faible et non spécifique le LPS et/ou le saturant. Les signaux obtenus avec les sera de souris infectées varient. Dans le cas des souris infectées avec *Brucella abortus* biovar 9 et *Brucella melitensis* 16M, les signaux des sera provenant de la saignée 2 (cinq semaines post-infection) sont nettement plus élevés que le bruit de fond (Figure 11.A). La réponse immunitaire humorale de la souris contre le LPS est donc mise en évidence ici. Les signaux correspondant aux sera de la saignée 2 dépassent d'ailleurs la valeur maximale que le lecteur de plaque est capable de mesurer.

Les signaux des sera provenant de la saignée 2 sont très faibles dans le cas des souris infectées par *Brucella abortus* 544 et pas différent du bruit de fond inhérent aux sera dans le cas des souris infectées par *Yersinia enterocolitica* O:9 (Figure 11.A). Si les infections avec *Brucella abortus* 544 et *Yersinia enterocolitica* O:9 avaient fonctionné, nous aurions dû observer un signal avec ces sera sur ce LPS, correspondant à la reconnaissance des épitopes C et C/Y.

Comme attendu, les sera des souris qui ont reçu du PBS (contrôle d'infection), donnent, cinq semaines après l'injection, un signal égal au bruit de fond (Figure 11.A).

### 2.2.2. LPS W99 (A dominant)

Les anticorps des souris infectées par *Brucella abortus* biovar 9 et *Brucella melitensis* 16M montrent des réactions croisées sur ce LPS (Figure 11.B). Les signaux observés après cinq semaines d'infection (saignée 2) sont plus importants que le bruit de fond et correspondant à la reconnaissance des épitopes C et C/Y.

Les anticorps des souris infectées par *Brucella abortus* 544 et *Yersinia enterocolitica* O:9 ne montrent qu'une faible reconnaissance pour le LPS W99 (Figure 11.B). Nous nous attendions à ce que ce signal soit faible. Puisque les souris n'ont pas produit d'anticorps spécifiques contre la bactérie entière, il est logique qu'il n'y en ait pas contre son LPS.

### 2.2.3. LPS de *Yersinia enterocolitica* O:9

Les anticorps des souris infectées par *Brucella melitensis* 16M, *Brucella abortus* biovar 9, *Brucella abortus* 544 et celles ayant reçu du PBS ne montrent aucune réactivité pour le LPS de *Yersinia enterocolitica* O:9 (Figure 11.C). Nous nous attendions à observer des réactions croisées avec les sera des souris infectées par *Brucella abortus* biovar 9 et *Brucella melitensis* 16M dues à la présence dépitopes C/Y. Les résultats obtenus avec les sera des souris infectées par *Yersinia enterocolitica* O:9 prélevés cinq semaines après l'infection (S2) (Figure 11.C) sont en accord avec ceux obtenus sur la bactérie entière.

Il semble donc que les souris infectées par *Brucella abortus* 544 et *Yersinia enterocolitica* O:9 n'ont pas produit d'anticorps ni contre la bactérie ayant servi à l'infection ni contre son LPS.

## 2.3. Problèmes rencontrés avec *Brucella abortus* 544 et *Yersinia enterocolitica* O:9

### 2.3.1. *Brucella abortus* 544

Dans le cas des souris infectées avec *Brucella abortus* 544, nous ne pouvons pas écarter la possibilité d'une coinfection. En effet, les souris présentaient des symptômes inhabituels à une infection par *Brucella abortus* 544. Il se peut que la réponse immunitaire contre *Brucella abortus* 544 ait été masquée par l'invasion d'un second pathogène putatif.

Au vu des résultats obtenus précédemment, nous avons donc recommencé les infections avec *Brucella abortus* 544 en suivant le même protocole, mais en vérifiant la présence de *Brucella* dans la souris, cinq et sept semaines après l'infection. Le tableau suivant reprend chaque souris et le nombre de bactéries estimé dans chaque rate.

Souris (n°)	Nombre de bactéries dans la rate
0	5 semaines : indénombrable
1	Morte après 5 semaines
2	7 semaines : 5,8 log
3	7 semaines : 5,5 log
4	7 semaines : 6,2 log
5	5 semaines : 4,6 log
6	5 semaines : 4,6 log
7	5 semaines : 5,4 log



Ces bactéries étaient résistantes à l'acide nalidixique (Nal) et une incubation de 3 jours à 37°C était nécessaire pour la visualisation des colonies. Nous avons également réalisé une coloration de Gram sur ces mêmes colonies et il s'agit de bactéries à Gram négatif. De plus, le nombre de bactérie correspond à ce qui est décrit dans la littérature [44]. Ces résultats nous indiquent qu'il s'agit de *Brucella*.

Une autre explication possible à la non production d'anticorps spécifiques du LPS serait que les bactéries n'aient pas de chaîne O ou que, suite à l'infection, elles l'aient perdu. Afin de vérifier que les bactéries que nous avons injecté aux souris possédaient une chaîne O, nous avons testé l'anticorps monoclonal 2C8<sup>18</sup> sur les doses infectantes lors d'un ELISA indirect. Celui-ci nous indiquait que la chaîne O était bien présente. Nous avons également réalisé un test au cristal violet (Voir Matériel et Méthodes 1.5) sur les bactéries récupérées dans la rate. Elles possédaient une chaîne O.

Cependant, les résultats obtenus en ELISA indirects sur les LPS et sur les bactéries entières avec ces nouveaux sera sont comparables à ceux obtenus lors des premières infections. Les bactéries sont bien présentes dans les rates des souris et cependant nous ne détectons aucunement la présence d'anticorps spécifiques du S-LPS.

### 2.3.2. *Yersinia enterocolitica* O:9

Comme nous n'avons pas obtenu des sera positifs avec *Yersinia enterocolitica* O:9, nous avons également recommencé les infections. Lors de ces secondes infections, nous avons essayé d'autres protocoles d'infection. Nous avons infecté les souris via trois voies d'entrée différentes décrites dans la littérature [44-46].

De plus, après huit semaines d'infection, nous avons récupéré les matières fécales et nous les avons étalées sur boîtes afin de vérifier la présence de la bactérie. Nous avons obtenu des colonies de bactéries résistantes à l'ampicilline après deux jours de croissance à 28°C, comme *Yersinia enterocolitica* O:9.

Nous avons également testé en ELISA indirect la dose infectante avec l'anticorps monoclonal 4F9<sup>19</sup>. Le résultat nous indique que la chaîne O de la bactérie est présente.

<sup>18</sup> B66-2C8. Anticorps monoclonal spécifique de l'épitope A [18, 23].

<sup>19</sup> B66-4F9. Anticorps monoclonal spécifique de l'épitope C/Y [18, 23].



Le tableau suivant reprend les protocoles d'infection ainsi que la vérification des doses infectantes.

Souches	Nombre de souris	Voie d'entrée	Volume	Vérification de la dose infectante (nb bactéries)
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	4	IP	100 µl	$6,2 \cdot 10^5$
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	4	IG	100 µl	$6,2 \cdot 10^5$
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	4	IM	50 µl	$6,2 \cdot 10^5$

IP : intrapéritonéal ; IG : intragastrique ; IM : intramusculaire.

Les résultats obtenus en ELISA indirects sur les LPS et sur les bactéries entières avec ces nouveaux sera sont comparables à ceux obtenus lors des premières infections.

Sur base de ces résultats, nous ne savons pas pourquoi nous n'avons pas eu production d'anticorps, alors que les bactéries semblaient présentes dans les rates pour *Brucella abortus* 544 et les matières fécales pour *Yersinia enterocolitica* O:9. Certaines bactéries sont capables de modifier la structure de leur chaîne O ou de la perdre suite à l'infection, mais ces mécanismes n'ont jamais été décrits chez *Brucella* ni chez *Yersinia*[47]. Nous avons donc continué la suite du travail avec les sera des souris infectées par *Brucella abortus* biovar 9 et *Brucella melitensis* 16M.

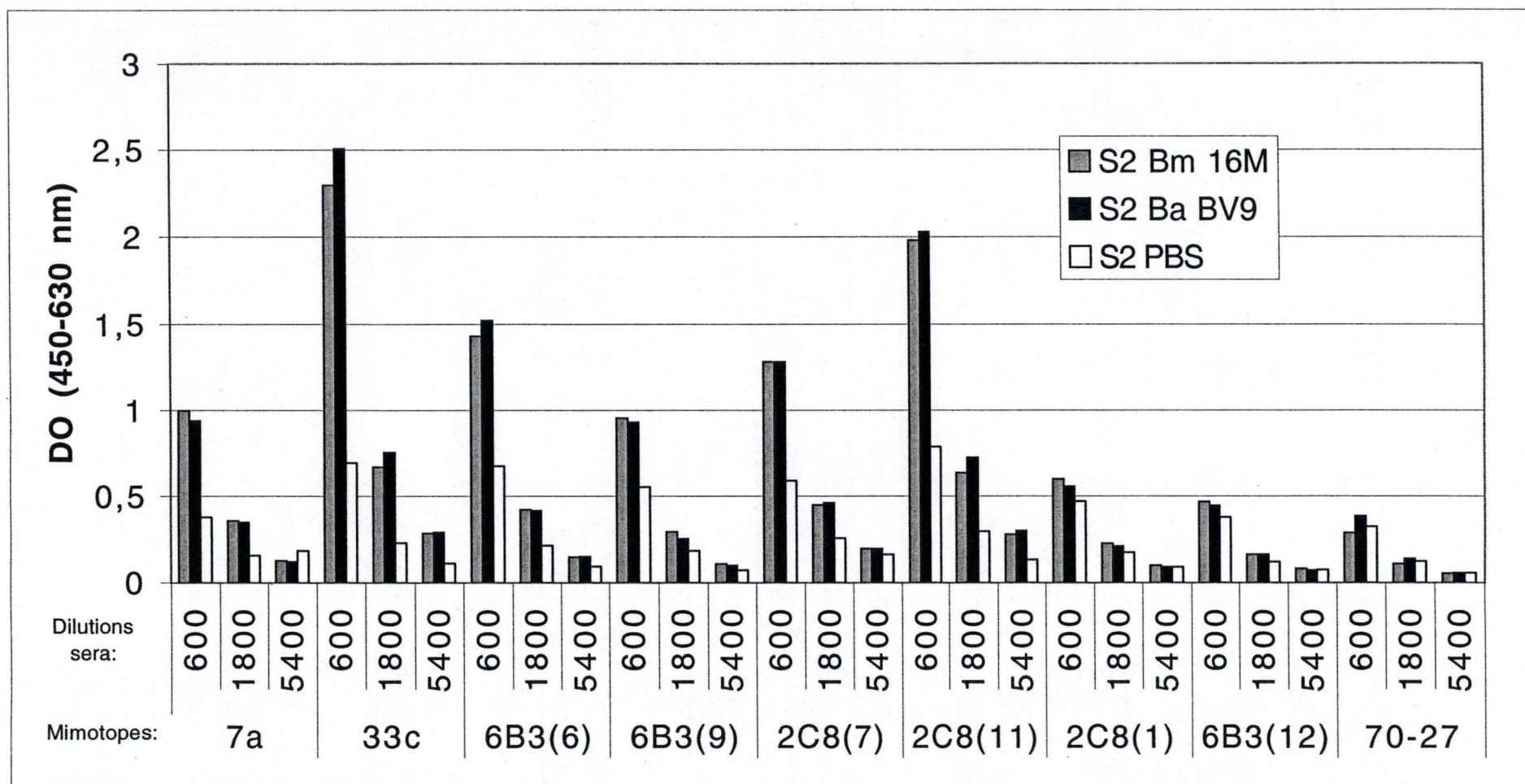
### **3. Test des différentes saignées sur les peptides mimotopes présentés à la surface de phage**

Nous voulons savoir si les anticorps présents dans les sera des souris infectées par *Brucella* reconnaissent les différents mimotopes de la chaîne O de *Brucella*. En effet, dans une perspective diagnostique, nous nous sommes intéressés à la reconnaissance spécifique de nos mimotopes par des sera d'animaux infectés par cette bactérie.

Pour ces tests, nous avons utilisé des phages présentant les mimotopes 7a, 33c, 2C8(1), 2C8(7), 2C8(11), 6B3(9), 6B3(6) et 6B3(12). Comme contrôle de spécificité, nous avons utilisé un phage irrelevant : le peptide 70-27<sup>20</sup>. Avant de tester ces différentes préparations de phages avec les sera de souris infectées, nous avons vérifié

<sup>20</sup> Il s'agit d'un phage portant un peptide mimotope d'une structure de surface de *Neisseria meningitidis*. Les signaux obtenus en ELISA indirect avec les différents sera sur ce phage correspondent au bruit de fond de la préparation phage.





**Figure 12:** ELISA indirect des différents pools de sera sur les mimotopes présentés à la surface de phages. Les dilutions de chaque pool de sera ainsi que les mimotopes sur lesquels ils sont testés sont représentés en abscisse. Les sera testés sont les pools de sera (prélevés cinq semaines post-infection) des souris ayant été infectées par *Brucella melitensis* 16M (S2 Bm 16M), *Brucella abortus* biovar 9 (S2 Ba BV9) et les souris ayant reçu uniquement du PBS. L'ordonnée reprend la densité optique à 450-630 nm.

leur reconnaissance par les anticorps monoclonaux ayant servi à les sélectionner (Annexe 2). Les différents mimotopes sont bien reconnus par leurs anticorps monoclonaux respectifs et le 70-27 n'est pas reconnu par ces trois anticorps monoclonaux. Pour chaque préparation de phages, nous avons également utilisé comme second contrôle les sera des souris ayant reçu du PBS. Les signaux observés avec ces sera nous informent sur le bruit de fond inhérent aux sera.

Nous avons réalisé deux ELISA indirects :

### 3.1. ELISA indirect sur les mimotopes

Le premier ELISA indirect a été réalisé avec les concentrations et dilutions suivantes (Figure 12) :

Phage (particules de phages/ml)	Dilution sera
$5.10^{11}$	600, 1800 et 5400

Nous avons testé les trois sera (S2 Bm 16M, S2 Ba BV9 et S2 PBS) sur les huit peptides mimotopes de la chaîne O présentés à la surface de phage (7a, 33c, 2C8(1), 2C8(7), 2C8(11), 6B3(9), 6B3(6), 6B3(12)) ainsi que sur le phage présentant le peptide 70-27 (Figure 12).

Les signaux obtenus avec les sera Ba BV9 et Bm 16M sur le mimotope 7a ont plus de deux fois l'intensité du signal obtenu avec le sera PBS sur ce même peptide (Figure 12). Les valeurs obtenues avec les deux sera de souris infectées (Ba BV9 et Bm 16M) ne présentent pas une grande différence. Le signal avec le sera Bm 16M est légèrement plus élevé.

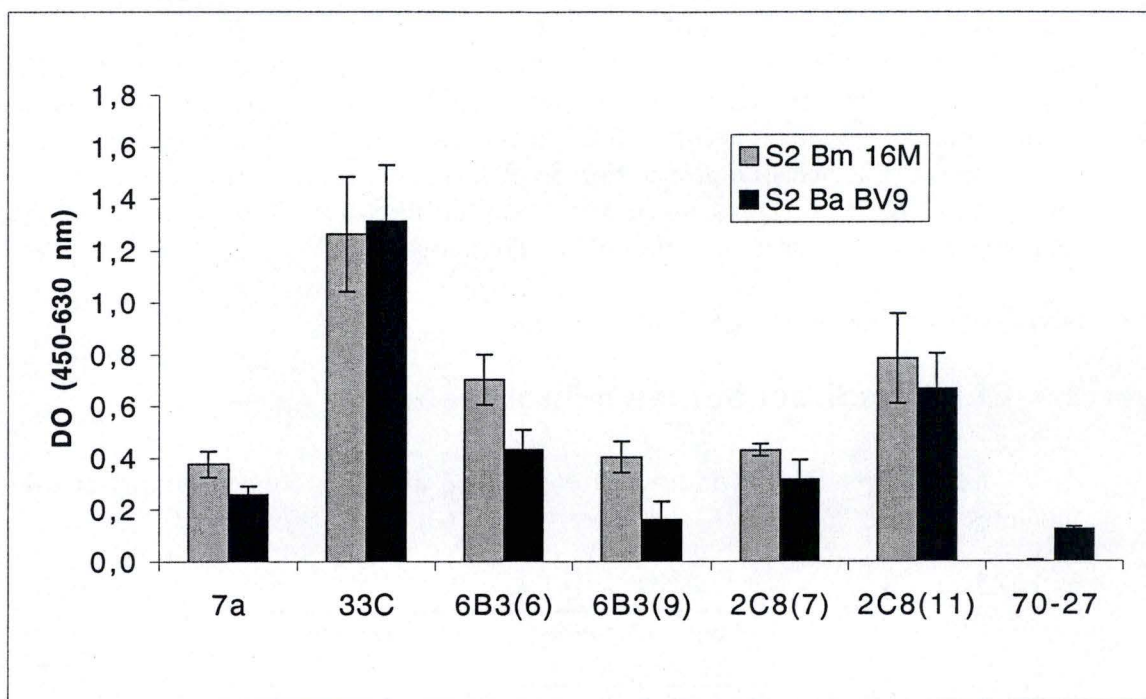
Sur le mimotope 33c, le signal obtenu avec les sera Ba BV9 est le plus grand. Il est suivi de près par les sera Bm 16M. Ces deux signaux sont trois fois plus intenses que le signal obtenu avec les sera PBS.

Les signaux obtenus avec les sera Bm 16M et Ba BV9 sur le mimotope 6B3(6) sont similaires et supérieurs à 2 fois l'intensité du signal obtenu avec les sera PBS (Figure 12).

Le mimotope 6B3(9) est également reconnu de manière équivalente par les sera Bm 16M et Ba BV9. Les valeurs obtenues avec ces deux sera dépassent une fois et demi l'intensité du signal des sera PBS sur ce même peptide.

Les mimotopes 2C8(7) et 2C8(11) sont reconnus de la même manière par les deux sera de souris infectées (Bm 16M et Ba BV9) et leur intensité est deux fois plus élevée que l'intensité des sera PBS (Figure 12). Nous ne nous attendions pas à ce que les sera de souris infectées par *Brucella abortus* biovar 9 et *Brucella melitensis* 16M reconnaissent ces mimotopes. Ces deux souches sont décrites comme étant M dominantes et ne présente donc pas d'épitopes A. Les anticorps produits suite à une infection avec les deux souches M dominantes ne devraient donc pas reconnaître des mimotopes de l'épitope A. Nous avons cependant testé l'anticorps monoclonal 2C8 (défini comme spécifique de l'épitope A) sur le LPS de *Brucella melitensis* 16M. Il s'avère que cet





**Figure 13:** ELISA indirect des sera en triplicats sur les peptides mimotopes présentés à la surface de phage. Les différents mimotopes sont en abscisse. Les sera (en pool, dilué 600 X) des souris infectées par *Brucella melitensis* 16M et *Brucella abortus* biovar 9 (S2 Bm 16M et S2 Ba BV9) sont testés sur chaque mimotopes. L'ordonnée reprend la densité optique à 450-630 nm. Les valeurs de DO observées sur chaque mimotope sont le résultat de la soustraction de la valeur obtenue avec les sera de souris infectées aux valeurs obtenues avec les sera PBS en pool (S2) sur le même mimotope.

anticorps monoclonal donne un signal sur le LPS ed *B. melitensis* 16M. Ceci pourrait expliquer pourquoi les deux sera M spécifiques (Bm 16M et Ba BV9) reconnaissent les mimotopes obtenus avec l'anticorps monoclonal 2C8.

Les mimotopes 2C8(1) et 6B3(12) sont également reconnus par les sera de souris infectées, mais les signaux obtenus sont inférieurs à 1,5 fois la valeur obtenue avec les sera PBS sur ces mêmes peptides (Figure 12). De plus, contrairement aux autres mimotopes, l'intensité des signaux obtenus avec les différents sera est similaire à celle sur le phage irrelevant. C'est pourquoi nous avons choisi ne pas les utiliser dans la suite du travail. Cette apparente absence de reconnaissance spécifique des sera de souris infectées (Bm 16M et Ba BV9) pour ces mimotopes peut s'expliquer par le fait que les interactions entre ces mimotopes et leurs anticorps monoclonaux respectifs ne correspondent pas aux interactions faites entre ces anticorps monoclonaux et l'épitope naturel sur la chaîne O du LPS.

### 3.2. ELISA en triplicat

Afin de confirmer les résultats obtenus au point 3.1, nous avons réalisé un second ELISA indirect en triplicat avec les concentrations de phage et dilutions de sera suivantes (Figure 13):

Phage (particules de phages/ml)	Dilution sera
$5.10^{11}$	$600^{21}$

Nous avons testé les trois sera (Bm 16M, Ba BV9 et PBS) en triplicat sur les phages positifs (7a, 33c, 2C8(7), 2C8(11), 6B3(9), 6B3(6)), c'est-à-dire ceux pour lesquels les sera Bm 16M et Ba BV9 semblaient spécifiques (point 3.1) ainsi que sur le phage portant le peptide 70-27 (Figure 13).

Pour chaque peptide, nous avons soustrait aux signaux obtenus avec les sera Bm 16M et Ba BV9 la valeur du signal obtenu avec le sera PBS sur la même préparation de phages. Les signaux observés avec les sera PBS sur les différentes préparations de phages correspondent au bruit de fond des anticorps naturellement présents chez la souris sur la préparation de phages testée. Au cours de leur vie, les souris produisent naturellement des anticorps contre *E. coli*. Vu que les phages ont été préparés à partir culture de *E. coli*, des protéines de cette bactérie contaminent nos différentes préparations de phage, et ce de manière variable d'une préparation à l'autre. Ceci pourrait expliquer une partie du signal obtenu avec les sera PBS et les différences entre les préparations de phages. En soustrayant pour chaque préparation de phage le signal des sera PBS au signal donné par les sera de souris infectées (par *Brucella abortus* biovar 9 et *Brucella melitensis* 16M), nous obtenons le signal spécifique sur le peptide mimotope.

<sup>21</sup> La dilution 600 X a été choisie lors du premier ELISA sur les mimotopes (point 3.1). L'intensité des signaux avec cette dilution ne dépasse pas l'intensité maximale détectable par l'appareil avec les sera des souris infectées et est faible avec les sera PBS.



Nous pouvons voir que le signal sur le phage irrelevant (70-27) est nul pour les sera Bm 16M et faible pour les sera Ba BV9 (Figure 13). Ceci nous indique qu'une infection par *Brucella* ne modifie pas la réactivité des anticorps du sérum pour la préparation de phage. En d'autres termes, l'infection n'augmente pas le bruit de fond des anticorps du sérum sur la préparation de phage.

Il ne semble pas avoir de différences entre les sera des souris infectées par *B. melitensis* 16M et *B. abortus* biovar 9 sur les mimotopes 7a, 33c, 2C8(7) et 2C8(11). Sur les mimotopes 6B3(6) et 6B3(9), les sera des souris infectées par *B. melitensis* 16M ont une réactivité plus grande. Dans l'ensemble, nous pouvons dire que la réactivité des sera des souris infectées avec *Brucella melitensis* 16M ou *Brucella abortus* biovar 9 est équivalente. Ceci est contraire à ce que nous attendions. En effet, deux des trois anticorps monoclonaux (2C8 et 6B3) démontraient une différence de réactivité vis-à-vis des deux bactéries (Annexe 1). Les anticorps monoclonaux 2C8 et 6B3 reconnaissent mieux *Brucella abortus* BV9 que *Brucella melitensis* 16M. Dans ce cas, nous nous attendions à ce que des sera de souris infectées par *Brucella abortus* biovar 9 présentent une réactivité plus forte pour les mimotopes sélectionnés avec le 2C8 et le 6B3.

#### 4. Test des sera en individuel

Nous avons voulu voir si les différentes souris d'un même groupe d'infection ont répondu de la même manière sur tous les mimotopes, et si la réponse anti-mimotope et la réponse anti-LPS sont corrélées. Nous avons donc réalisé deux ELISA indirects où nous avons testé la reconnaissance de chaque sérum individuellement sur les phages porteurs de mimotopes et le LPS.

##### 4.1. ELISA indirect sur les mimotopes

Nous avons testé les sera de chaque souris sur les peptides mimotopes 7a, 33c, 2C8(7), 2C8(11), 6B3(9) et 6B3(6) ainsi que sur le phage portant le peptide 70-27 (Figure 14.A-C). Le tableau suivant reprend les concentrations de phages et les dilutions de sera utilisées.

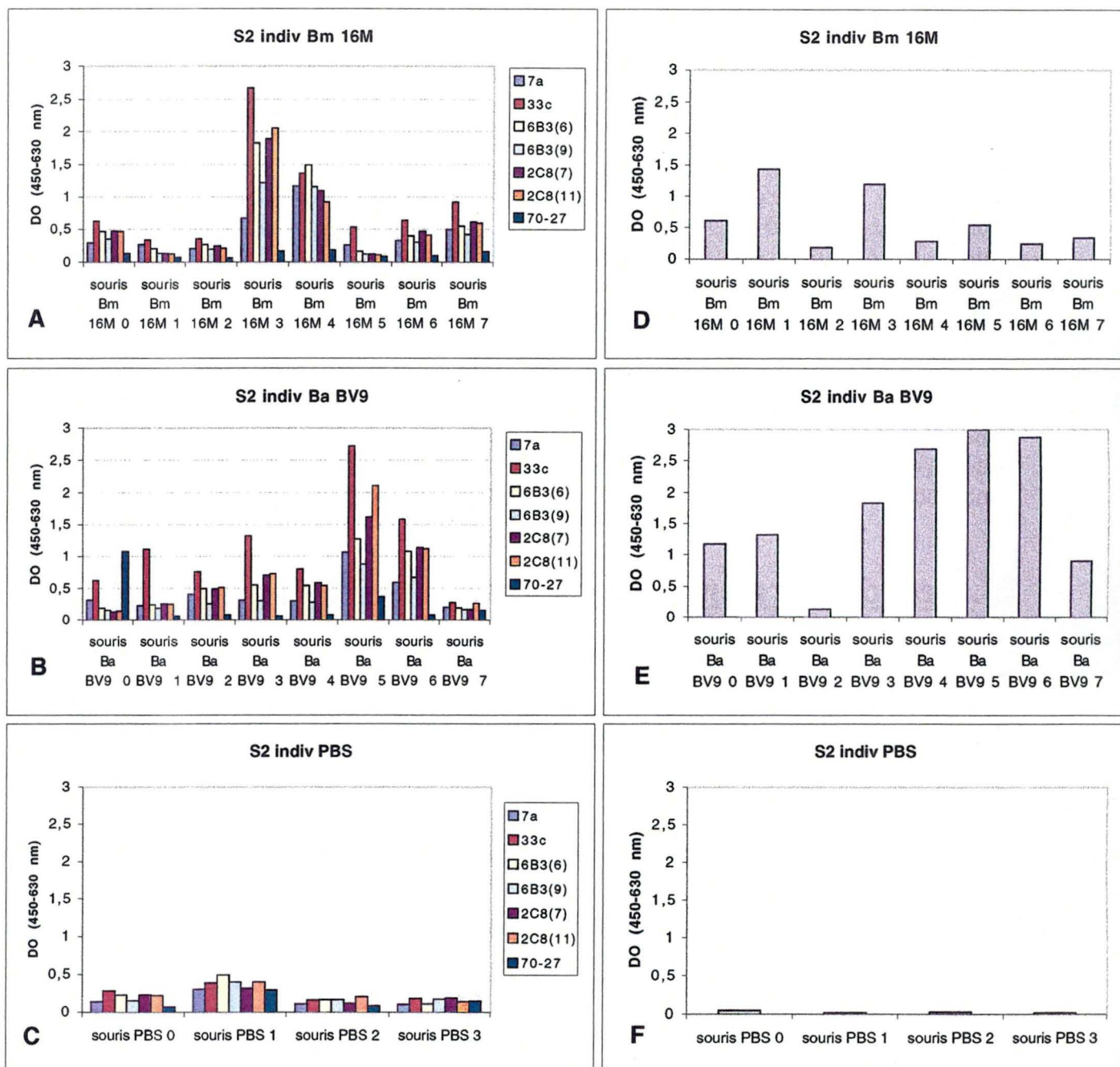
Phage (particules de phages/ml)	Dilution sera <sup>22</sup>
$5.10^{11}$	1200

##### 4.1.1. Souris infectées par *Brucella melitensis* 16M (Bm 16M 0 à Bm 16M 7<sup>23</sup>)

Nous pouvons voir que les sera des souris ne présentent pas toutes le même profil de réactivité pour les différents mimotopes (Figure 14.A). Les sera des souris Bm 16M 3 et Bm 16M 4 ont les réactivités les plus importantes sur tous les peptides

<sup>22</sup> Nous avons également réalisé cet ELISA avec une dilution de sera de 600X. Cependant, à cette dilution, certaines valeurs obtenues dépassaient la capacité de mesure du lecteur de plaque.

<sup>23</sup> Chaque souris est nommée par les initiales de la bactérie infectante ainsi que d'un numéro.



**Figure 14:** ELISA indirects des sera en individuel sur les mimotopes et sur le LPS de *Brucella melitensis* 16M. A. Sera des souris infectées par *Brucella melitensis* 16M testés sur les mimotopes. B. Sera des souris infectées par *Brucella abortus* biovar 9 testés sur les mimotopes. C. Sera des souris contrôle (PBS) testés sur les mimotopes. D. Sera des souris infectées par *Brucella melitensis* 16M testés sur le LPS de *Brucella melitensis* 16M. E. Sera des souris infectées par *Brucella abortus* biovar 9 testés sur le LPS de *Brucella melitensis* 16M. F. Sera des souris contrôle (PBS) testés sur le LPS de *Brucella melitensis* 16M. Tous les sera ont été prélevés cinq semaines après l'infection et utilisés à une dilution 1200 sur les mimotopes et 54000 sur le LPS de *Brucella melitensis* 16M. La densité optique à 450-630 nm est en abscisse.



mimotopes. Aucune souris ne présente une forte réactivité de ses anticorps pour le peptide 70-27. Sept souris sur huit reconnaissent mieux le mimotope 33c que les autres mimotopes. Dans l'ensemble, les mimotopes 6B3(9) et 7a semblent être les moins bien reconnus (Figure 14.A).

#### 4.1.2. Souris infectées par *Brucella abortus* biovar 9 (Ba BV9 0 à Ba BV9 7)

Ici également, les réactivités des anticorps murins pour les mimotopes varient grandement d'une souris à l'autre (Figure 14.B). La souris Ba BV9 5 présente les meilleurs résultats sur tous les mimotopes. Le mimotope 33c est aussi celui qui est le mieux reconnu chez six souris sur huit. Comme avec les sera de souris infectées avec *Brucella melitensis* 16M, les mimotopes 6B3(9) et 7a semblent être les mimotopes les moins bien reconnus. De manière étonnante, les anticorps de la souris Ba BV9 0 reconnaissent très fortement le peptide 70-27<sup>24</sup> (Figure 14.B).

#### 4.1.3. Souris ayant reçu du PBS (PBS 0 à PBS 3)

Les quatre souris présentent une homogénéité de réponse sur l'ensemble des peptides, aussi bien le peptide 70-27 que tous les autres (Figure 14.C).

De manière générale, nous pouvons dire qu'aucun sera des souris infectées par *Brucella abortus* biovar 9 et *Brucella melitensis* 16M ne reconnaît le peptide 70-27 (contrôle), à l'exception de la souris Ba BV9 3. Nous remarquons que le peptide 33c est mieux reconnu par les sera de souris infectées que les autres peptides mimotopes (souris Bm 16M 0, 1, 2, 3, 5, 6, Ba BV9 1, 2, 3, 4, 5 et 6). Ces résultats confirment ceux obtenus en pool de sera sur les peptides.

## 4.2. ELISA indirect sur le LPS

Nous avons également testé les sera S2 Bm 16M, S2 Ba BV9 et S2 PBS de chaque souris mais cette fois sur le LPS de *Brucella melitensis* 16M (Figure 14.D-F). Le tableau ci-dessous présente les différentes concentrations et dilutions utilisées.

LPS (µg/ml)	Dilution sera <sup>25</sup>
1	54000

<sup>24</sup> Cette donnée explique pourquoi nous avons une valeur plus élevée pour le pool de sera BV9 qu'avec le pool de sera 16M sur le peptide 70-27 (ELISA en triplicats, point 3.2).

<sup>25</sup> C'est à cette dilution que nous pouvons comparer les signaux obtenus en ELISA indirect avec les sera des souris sur le LPS sans que ceux-ci dépassent la capacité de mesure du lecteur de plaque. À une dilution plus faible, 18000 X par exemple (résultats non montrés), il est impossible de visualiser les différences entre certaines souris (Ba BV9 0, Ba BV9 1, Ba BV9 3, Ba BV9 4, Ba BV9 5, Ba BV9 6 et Ba BV9 7) car les valeurs d'absorbance sont trop élevées pour être mesurées par le lecteur de plaque.

#### **4.2.1. Souris infectées par *Brucella melitensis* 16M (Bm 16M 0 à Bm 16M 7)**

La première information que nous pouvons retirer de ces résultats est que toute les souris n'ont pas répondu de la même manière suite à l'infection alors que les doses infectantes sont les mêmes. La souris Bm 16M 1 et Bm 16M 3 répondent relativement mieux sur le LPS de *B. melitensis* 16M (Figure 14.D).

#### **4.2.2. Souris infectées par *Brucella abortus* biovar 9 (Ba BV9 0 à Ba BV9 7)**

De manière encore plus flagrante que pour les souris infectées par *Brucella melitensis* 16M, la réponse suite à l'infection par *Brucella abortus* biovar 9 est très variable d'une souris à l'autre (Figure 14.E). La souris Ba BV9 5 répond le mieux sur le LPS. La valeur est d'ailleurs supérieure à ce que le lecteur de plaque est capable de mesurer. À l'opposé, la souris Ba BV9 2 donne un signal très faible sur le LPS (Figure 14.E).

#### **4.2.3. Souris ayant reçu du PBS (PBS 0 à PBS 3)**

Comme attendu, les anticorps des quatre souris utilisées comme contrôle d'infection ne montrent pas de réactivité pour le LPS de *Brucella melitensis* 16M (Figure 14.F).

Ces résultats nous indiquent que des souris du même âge et ayant un même génotype ne répondent pas de la même manière suite à une infection.
--

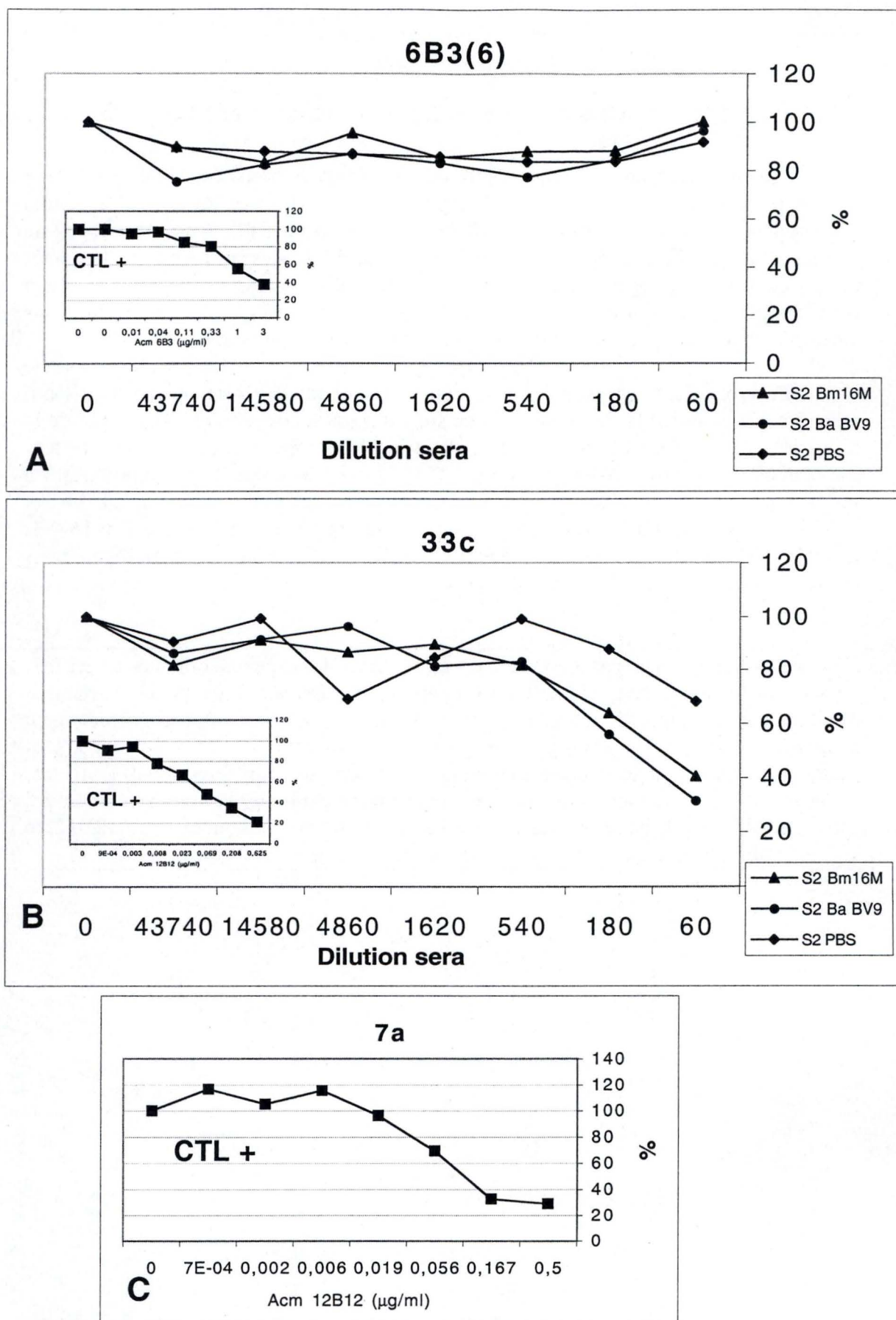


### 4.3. Comparaison des réponses anti-mimotope et anti-LPS

Premièrement, nous n'avons pas utilisé les mêmes dilutions de sera dans les deux ELISA présenté aux points 4.1 et 4.2. Après une infection par *Brucella*, les souris développent une réponse contre TOUS les épitopes du S-LPS. Nos mimotopes ne représentent que TROIS épitopes différents sur ce LPS. Les anticorps de la souris induits contre les épitopes reconnus par nos anticorps monoclonaux ne correspondent qu'à une petite fraction de l'ensemble des anticorps anti-LPS. C'est pourquoi nous devons donc utiliser une dilution de sera plus faible sur les mimotopes.

En comparant les deux ELISA, nous ne pouvons pas dire qu'une souris qui répond bien sur le LPS, répond aussi bien sur les mimotopes. Prenons l'exemple de la souris Bm 16M 1. Elle a le meilleur signal sur le LPS (entre toutes les souris infectées par *Brucella melitensis* 16M), mais une réactivité très faible pour les mimotopes. La souris Bm 16M 3 a une réactivité sur le LPS proche de celle de la souris Bm 16M 1 et cependant la souris Bm 16M 3 répond mieux sur les peptides que la souris Bm 16M 1. Les souris Ba BV9 1 et 2 ont une réponse globale identique sur les mimotopes, mais présentent une différence de réactivité sur le LPS.

Nous ne pouvons donc pas faire de lien direct entre les signaux obtenus en ELISA indirect sur le LPS et ceux obtenus sur les peptides mimotopes. Il existe une variabilité de souris à souris dans les réponses contre le LPS. Chaque souris répond normalement majoritairement contre les épitopes immunodominants. D'autres épitopes sont également présents. Il se pourrait que chaque souris réponde différemment contre ces épitopes non immunodominants. Nous pourrions donc expliquer la non corrélation des deux ELISA si nos mimotopes sélectionnés avec les anticorps monoclonaux 12B12, le 2C8 et le 6B3 miment des épitopes non immunodominants.



**Figure 15:** ELISA de compétition sur les mimotopes. A. 6B3(6). B. 33c. C. 7a. Les différentes dilutions de sera utilisées sont en abscisse. Le pourcentage du signal sans compétiteur est en ordonnée. Les compétitions ont été réalisées avec les sera (prélevés 5 semaines post-infection, S2) des souris infectées par *Brucella melitensis* 16M, *Brucella abortus* biovar 9 et les sera de souris contrôle (PBS). Pour chaque peptide, un contrôle positif a été réalisé avec l'anticorps monoclonal.



## **5. Compétition entre les anticorps des sera et les anticorps monoclonaux**

Nous avons la possibilité de savoir si des anticorps différents se lient au même épitope ou à des épitopes qui se chevauchent par un ELISA de compétition. Ici, nous voulons montrer que les anticorps monoclonaux biotinylés<sup>26</sup> peuvent être "chassés" par les anticorps présents dans les sera de souris infectées (S2 Bm 16M et S2 Ba BV9) et reconnaissant les différents phages porteurs de mimotopes. De plus, nous avons réalisé pour chaque peptide un contrôle positif. Nous avons utilisé les anticorps monoclonaux non biotinylés comme compétiteurs au lieu du sérum.

Le tableau ci-dessous reprend les différentes concentrations d'anticorps monoclonaux et de phage utilisés. Nous avons obtenu ces valeurs après une mise au point où nous avons testé différentes concentrations de phage et différentes concentrations d'anticorps monoclonaux biotinylés. Nous avons retenu les concentrations critiques pour lesquelles nous observons une chute du signal lorsque nous diminuons l'une ou l'autre concentration.

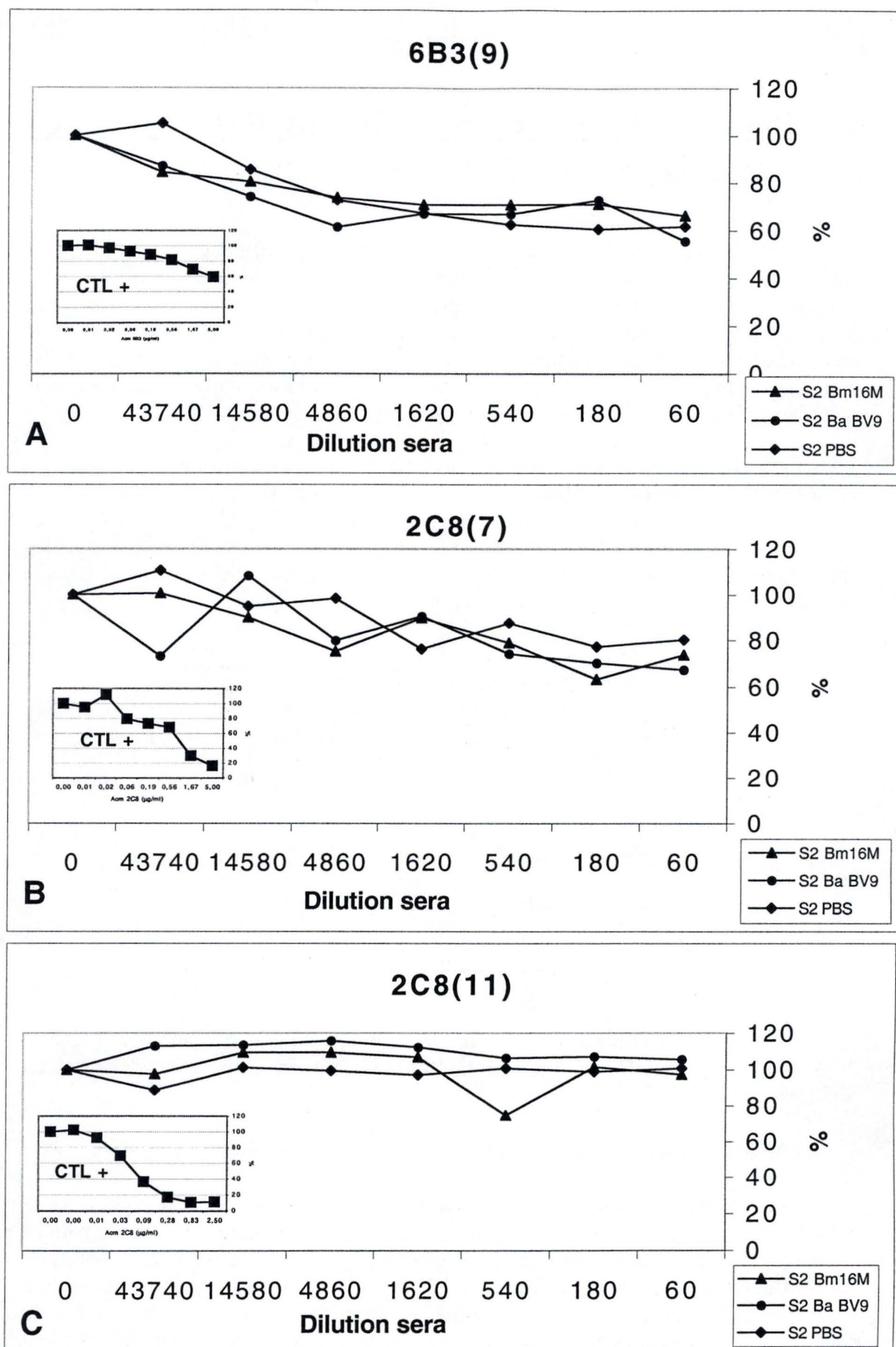
Peptide	Phage (particules de phages/ml)	Anticorps monoclonaux biotinylés (µg/ml)
7a	$1,3 \cdot 10^{10}$	12B12 : 0,5
33c	$1,3 \cdot 10^{10}$	12B12 : 0,625
6B3(6)	$5 \cdot 10^{10}$	6B3 : 3
6B3(9)	$5 \cdot 10^{10}$	6B3 : 5
2C8(7)	$2,5 \cdot 10^{10}$	2C8 : 5
2C8(11)	$10^{11}$	2C8 : 2,5

Nous avons obtenu des résultats similaires pour cinq des six mimotopes (2C8(7), 2C8(11), 6B3(9), 6B3(6) et 7a), le mimotope 33c donne quant à lui des résultats différents.

### ***Mimotopes 2C8(7), 2C8(11), 6B3(9), 6B3(6) et 7a***

Les résultats obtenus avec les contrôles positifs montrent qu'il est possible de chasser les anticorps monoclonaux fixés sur les peptides mimotopes avec les mêmes anticorps monoclonaux (Figures 15 et 16). Sans anticorps monoclonaux non biotinylés (compétiteurs), la DO observée correspond à 100 %. Nous observons dans tous les cas une diminution du signal quand la quantité de compétiteur augmente (dans le cas du contrôle positif). Nous pouvons remarquer que les concentrations de compétiteur varient

<sup>26</sup> Les anticorps monoclonaux et les anticorps des sera étant des anticorps de souris, nous ne pouvions pas utiliser un anticorps anti-souris pour discriminer la liaison de ces anticorps aux mimotopes.



**Figure 16:** ELISA de compétition. A. 6B3(9). B. 2C8(7). C. 2C8(11). Les différentes dilutions de sera utilisées sont en abscisse. Le pourcentage du signal sans compétiteur est en ordonnée. Les compétitions ont été réalisées avec les sera (prélevés 5 semaines post-infection, S2) des souris infectées par *Brucella melitensis* 16M, *Brucella abortus* biovar 9 et les sera de souris contrôle (PBS). Pour chaque peptide, un contrôle positif a été réalisé avec l'anticorps monoclonal.



d'un anticorps monoclonal à l'autre et d'un mimotope à l'autre. Prenons l'exemple de l'anticorps monoclonal 2C8 (Figure 16.B-C). Sur le peptide mimotope 2C8(7), 5 µg/ml sont nécessaires pour arriver à un signal correspondant à 15 % de celui observé sans compétiteur. Sur le mimotope 2C8(11), il suffit de 2,5 µg/ml d'anticorps monoclonal pour obtenir un signal de 10 %. Il en va de même pour le 6B3. Avec 5 µg/ml de 6B3 non biotinylé (compétiteur), le signal est de 60 % sur le peptide 6B3(9) (Figure 16.A) alors que 3 µg/ml suffisent pour obtenir un signal de 40 % sur le peptide 6B3(6) (Figure 15.A). Avec une concentration de 0,5 µg/ml de 12B12 non biotinylé, le signal observé sur le mimotope 7a n'est plus que de 30 %.

Lorsqu'on ajoute des quantités croissantes de sera, le signal diminue jusqu'à 60 % dans le cas du mimotope 6B3(9) (Figure 16.A). Cependant, aucune différence n'est observée entre les sera Bm 16M et Ba BV9 et les sera PBS pour tous ces peptides (Figures 15.A et 16.A-C). Cette compétition n'est donc pas spécifique. Pour le mimotope 7a, nous avons obtenu des résultats inexplicables, et ce à trois reprises (résultats non montrés). Cependant, en ajoutant les sera à une dilution de 60 X, il ne semble pas y avoir de différence entre les sera de souris infectées et les sera de souris PBS.

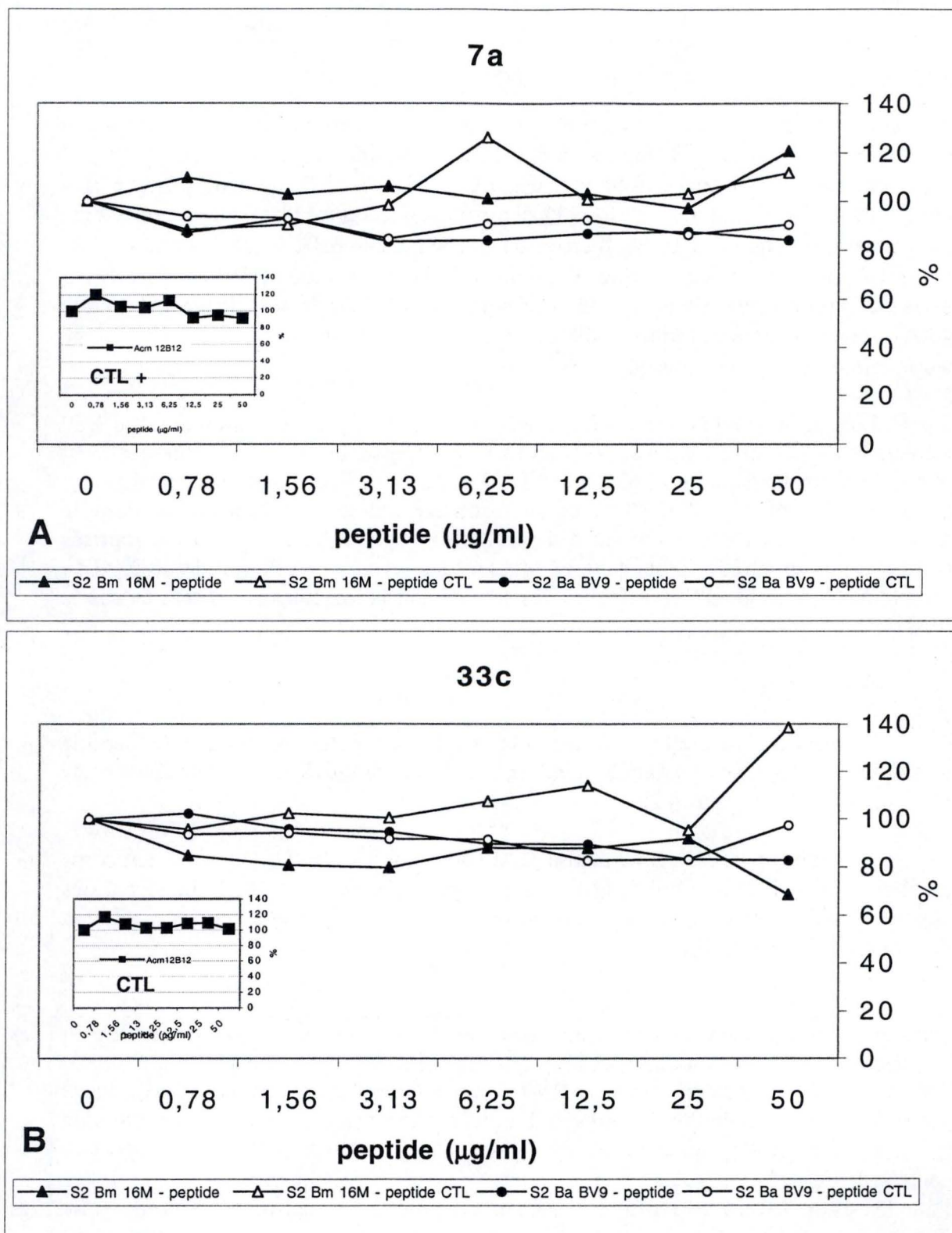
### *Mimotope 33c*

Le résultat du contrôle positif est similaire à celui obtenu sur le peptide mimotope 7a (Figure 15.B). 0,625 µg/ml de 12B12 non biotinylé suffit pour obtenir une diminution de signal jusqu'à 20 %.

Lorsque les sera Ba BV9 et Bm 16M sont dilués 60 X et ajoutés aux anticorps monoclonaux 12B12 biotinylés, le signal n'est plus que de 30 et 40 %. Le signal des anticorps monoclonaux est de 70 % lorsqu'ils sont mis en présence de la même dilution de sera PBS (Figure 15.B).

Dans le cas du peptide **mimotope 33c**, nous pouvons dire que nous avons pu mettre en évidence une compétition entre les anticorps des sera de souris infectées par *Brucella melitensis* 16M et *Brucella abortus* BV9 et les anticorps monoclonaux 12B12 dirigé contre le mimotope. De fait, en utilisant l'anticorps monoclonal à une concentration de 0,625 µg/ml et les sera dilués 60 X, nous avons observé une compétition par rapport au contrôle PBS.

Pour les **cinq autres mimotopes**, nous n'avons pas pu mettre en évidence une différence entre les compétitions par les sera de souris infectées et les sera PBS. Il est possible que l'affinité des anticorps monoclonaux pour leurs mimotopes soit trop forte que pour être déplacés par les anticorps des sera.



**Figure 17:** ELISA d'inhibition avec les peptides libres A. inhibition des sera sur le mimotope 7a. B. Inhibition des sera sur le mimotope 33c. Les différentes concentrations de peptides libres utilisés sont en abscisse. En ordonnée, on retrouve le pourcentage du signal obtenu sans inhibiteur. Les sera des souris infectées par *Brucella melitensis* 16M et *Brucella abortus* biovar 9 (en pools, 5 semaines après l'infection, S2) ont été utilisés avec le mimotope correspondant ainsi qu'avec un peptide contrôle. Un contrôle positif a été réalisé avec l'anticorps monoclonal.



## 6. Inhibition avec les peptides mimotopes libres

Dans le but de caractériser les anticorps des sera de souris infectées, nous avons également essayé d'inhiber la liaison entre les anticorps mis en évidence au point 3 par les peptides mimotopes libres synthétisés chimiquement (Figures 17 et 18).

Pour cet ELISA, nous avons utilisé le protocole décrit au point 5 du matériel et méthode. Les sera ont été incubés avec les mimotopes libres et ensuite déposés sur les phages présentant les mimotopes. Nous avons également réalisé pour chaque mimotope un contrôle positif où la liaison de l'anticorps monoclonal au mimotope sur phage était inhibé par le mimotope libre. Comme contrôle négatif, nous avons utilisé un peptide dont la séquence n'a aucun lien avec la séquence des mimotopes de la chaîne O de *Brucella*. Nous avons réalisé les inhibitions avec quatre mimotopes, le 7a, le 6B3(6), le 2C8(7) et le 33c. Nous ne possédons pas les autres mimotopes synthétisés chimiquement au laboratoire.

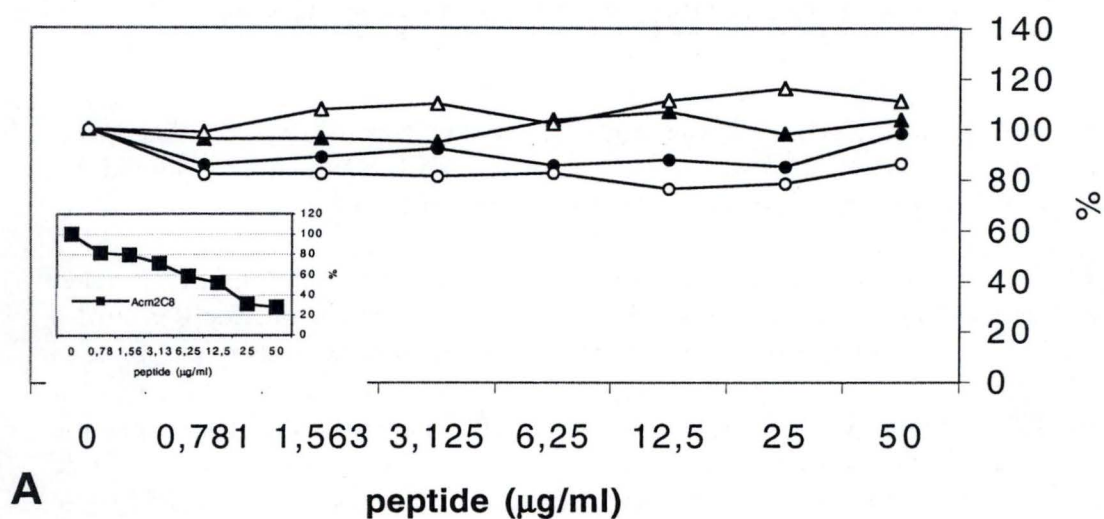
Le tableau suivant reprend les concentrations de peptides mimotopes adsorbés au fond des puits, les dilutions de sera et les dilutions d'anticorps monoclonaux utilisés lors des ELISA d'inhibition. Ces quantités de phage et d'anticorps correspondent à des intensités de signaux critiques, c'est-à-dire que si nous diminuons les concentrations de phages ou d'anticorps, nous observons une chute du signal très importante.

Peptide	Phages (particules de phages/ml)	Dilution sera
7a	$5.10^{11}$	600
33c	$1,6.10^{11}$	600
6B3(6)	$5.10^{11}$	600
6B3(9)	$5.10^{11}$	600
2C8(7)	$5.10^{11}$	600
2C8(11)	$1,6.10^{11}$	600

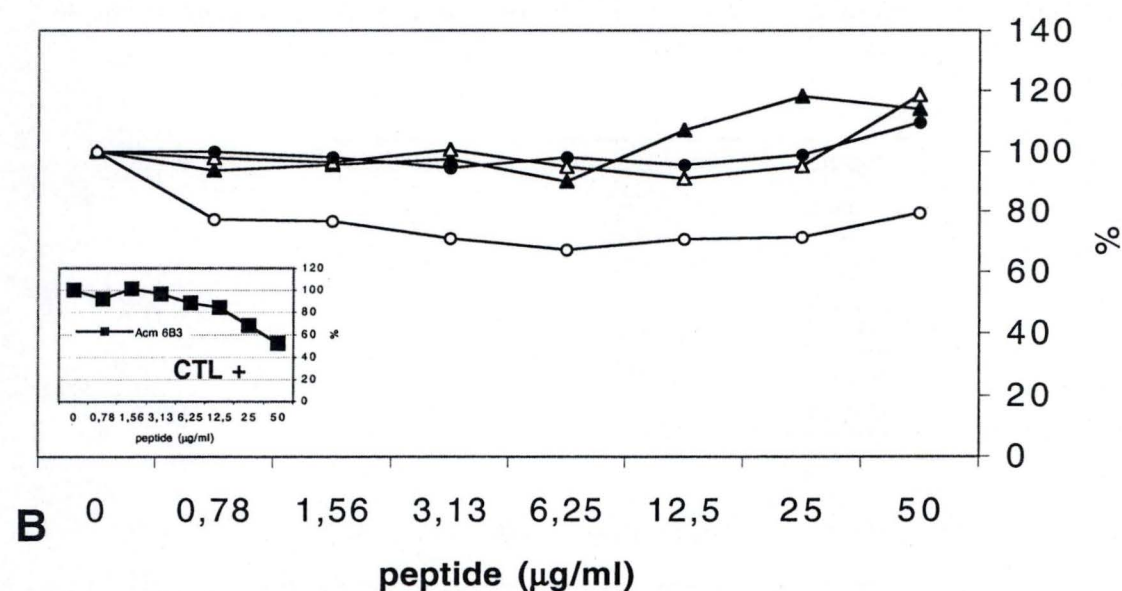
Concentrations utilisées pour les contrôles positifs avec les anticorps monoclonaux :

Peptide	Phages (particules de phages/ml)	Anticorps monoclonaux ( $\mu\text{g/ml}$ )
7a	$5.10^{10}$	12B12 : 0,16
33c	$5.10^{10}$	12B12 : 0,16
6B3(6)	$10^{11}$	6B3 : 2
6B3(9)	$2,5.10^{10}$	6B3 : 10
2C8(7)	$5.10^{10}$	2C8 : 1,25
2C8(11)	$5.10^{10}$	2C8 : 1,667

## 2C8(7)



## 6B3(6)



**Figure 18:** ELISA d'inhibition avec les peptides libres A. Inhibition des sera sur le mimotope 2C8(7). B. Inhibition des sera sur le mimotope 6B3(6). Les différentes concentrations de peptides libres utilisés sont en abscisse. En ordonnée, on retrouve le pourcentage du signal obtenu sans inhibiteur. Les sera des souris infectées par *Brucella melitensis* 16M et *Brucella abortus* biovar 9 (en pools, 5 semaines après l'infection, S2) ont été utilisés avec le mimotope correspondant ainsi qu'avec un peptide contrôle. Un contrôle positif a été réalisé avec l'anticorps monoclonal.



Dans le cas des mimotopes 7a et 33c, nous pouvons voir que les contrôles positifs réalisés avec les anticorps monoclonaux ne montrent pas une inhibition (Figure 17.A et B). En ajoutant 50 µg/ml de peptide avec le 12B12, le signal observé n'est pas différent du signal obtenu sans inhibiteur. Les contrôles positifs réalisés avec 50 µg/ml de peptide sur le mimotope 6B3(6) et sur le mimotope 2C8(7) montrent un signal équivalent à 50 et 30 % du signal obtenu sans inhibiteur (Figure 18.A et B).

Les résultats obtenus avec les sera Ba BV9 et Bm 16M sur les quatre mimotopes ne montrent aucune différence par rapport au contrôle négatif. Nous n'avons donc pas pu mettre en évidence une inhibition des anticorps des sera de souris infectées par les mimotopes libres.

Au vu des résultats des contrôles positifs (deux positifs sur quatre), il semble difficile d'inhiber la liaison d'un anticorps monoclonal au phage porteur de mimotopes avec le même mimotope libre. Ceci peut être expliqué par la présentation multivalente du mimotopes sur le phage qui permet une interaction avec l'anticorps monoclonal bivalent avec une forte avidité. Le mimotope soluble est quant à lui monovalent et ne possède donc pas cette avidité avec l'anticorps monoclonal. Néanmoins, pour les deux mimotopes pour lesquels les contrôles positifs étaient bons, nous n'avons pas pu démontrer la spécificité des anticorps par une inhibition avec les mimotopes solubles.

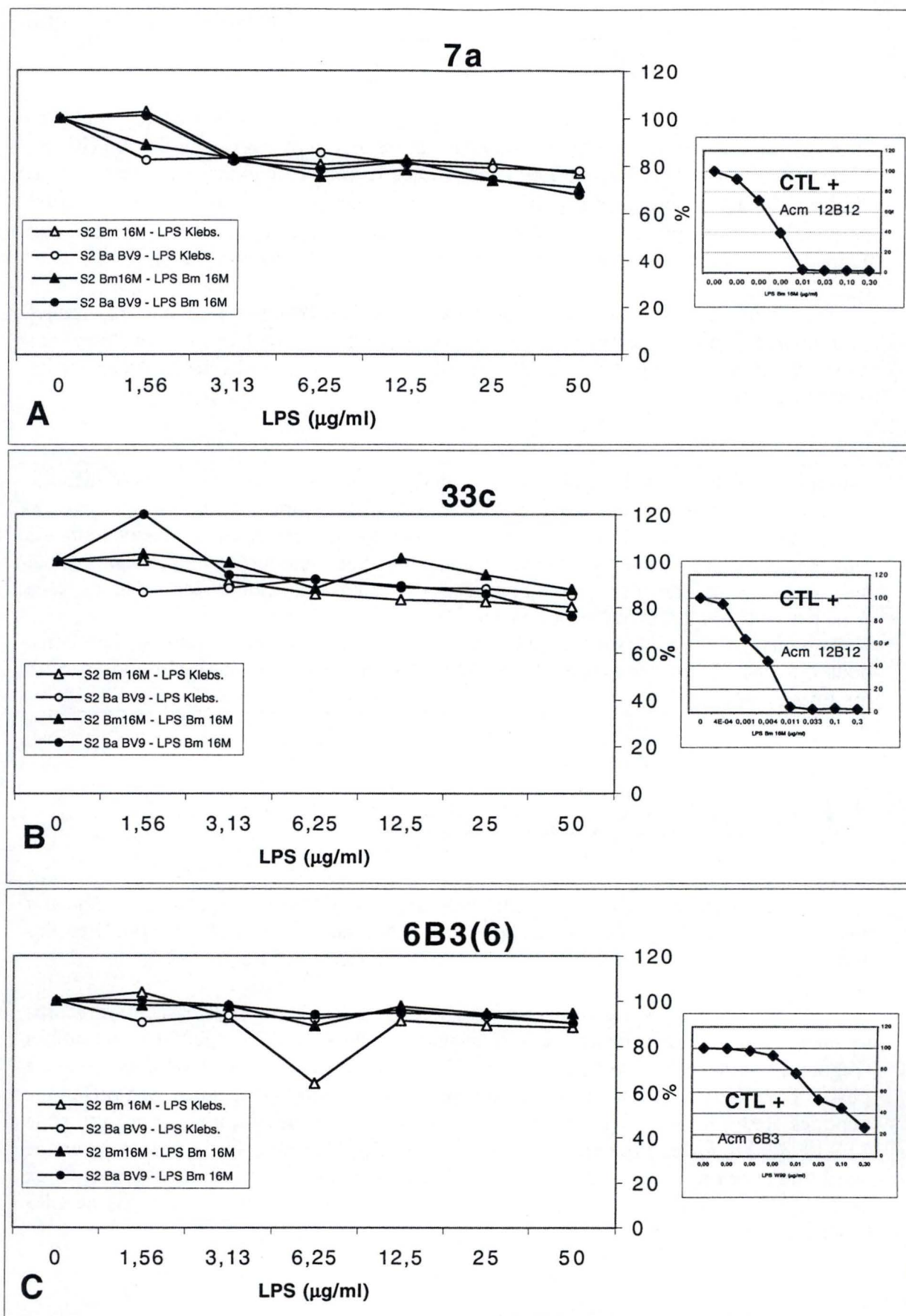
## 7. Inhibition avec le LPS soluble

Dans le but de vérifier si les anticorps des sera de souris infectées (avec *Brucella melitensis* 16M et *Brucella abortus* BV9) reconnaissant les mimotopes sont bien des anticorps anti-LPS, nous avons réalisé des inhibitions avec le LPS soluble.

Pour cet ELISA, les anticorps primaires (sera Bm 16M et Ba BV9 ou anticorps monoclonaux) sont incubés avec le LPS avant d'être déposés sur les peptides mimotopes (Figure 26, annexe 3). Pour chaque peptide mimotope, nous avons réalisé un contrôle positif pour lequel la liaison des anticorps monoclonaux spécifiques aux différents peptides était inhibée par le LPS. Comme contrôle de spécificité, nous avons utilisé le LPS de *Klebsiella pneumoniae* dont la structure de la chaîne O ne présente aucune similarité avec celle *Brucella* [48]. Un ELISA indirect avec les anticorps monoclonaux 12B12, 2C8 et 6B3 nous a permis de vérifier qu'ils ne reconnaissaient pas ce LPS (résultats non montrés).

### 7.1. ELISA d'inhibition

Les différentes dilutions et concentrations de phages portant les mimotopes, de sera et d'anticorps monoclonaux sont identiques à celles utilisées lors des inhibitions avec les mimotopes libres (Résultats et discussion point 6). Les contrôles positifs



**Figure 19:** ELISA d'inhibition avec le LPS. A. Inhibition sur le mimotope 7a. B. Inhibition sur le mimotope 33c. C. Inhibition sur le mimotope 6B3(6). L'abscisse reprend les concentrations de LPS utilisées. L'ordonnée présente le pourcentage du signal sans inhibiteur. Les sera des souris infectées par *Brucella melitensis* 16M et *Brucella abortus* biovar 9 (en pool, 5 semaines post-infection, S2) ont été testés avec le LPS de *Brucella melitensis* 16M ainsi qu'avec le LPS de *Klebsiella pneumoniae* (contrôle négatif). Pour chaque peptide, un contrôle positif a été réalisé avec l'anticorps monoclonal.



réalisés pour chaque mimotope indiquent qu'il est possible d'inhiber la liaison des anticorps monoclonaux aux mimotopes par l'ajout de LPS (Figures 19.A-C et 20.A-C). Dans le cas des mimotopes 7a et 33c (Figure 19.A et 19.B), en incubant les anticorps monoclonaux avec 0,011 µg/ml de LPS de *Brucella melitensis* 16M, nous inhibons totalement le signal (Figure 19.A et B). Sur les mimotopes 6B3(6) et 6B3(9) (Figures 19.C et 20.A), il faut ajouter une quantité plus grande de LPS pour inhiber totalement le signal des anticorps monoclonaux. Avec 0,3 µg/ml de LPS de *Brucella melitensis* 16M, le signal est de 30 % sur le 6B3(6) et de 10 % sur le 6B3(9). Sur le mimotope 2C8(7) (Figure 20.B), en incubant 10 µg/ml de LPS de *Brucella melitensis* 16M avec l'anticorps monoclonal 2C8, le signal est de 30 %. Sur le mimotope 2C8(11) (Figure 20.C), une quantité de 0,16 µg/ml de LPS de *Brucella melitensis* 16M incubée avec le 2C8 donne un signal de 20 %.

Puisque les différents épitopes mimés par nos peptides sont certainement représentés en nombre variable sur le LPS, il n'est pas étonnant qu'il faille des quantités différentes de LPS de *Brucella melitensis* 16M et de LPS W99 pour inhiber l'interaction entre les trois anticorps monoclonaux et leur mimotopes. De plus, un anticorps monoclonal reconnaît avec une affinité différente ses différents mimotopes. Les interactions entre le mimotope 2C8(7) et l'anticorps monoclonal 2C8 sont par exemple plus fortes qu'avec le mimotope 2C8(11).

Cependant, pour les six peptides, l'inhibition des sera par le LPS de *Brucella melitensis* 16M est faible (minimum 70 % avec 50 µg/ml) et équivalente à celle du contrôle négatif (LPS de *Klebsiella pneumoniae*).

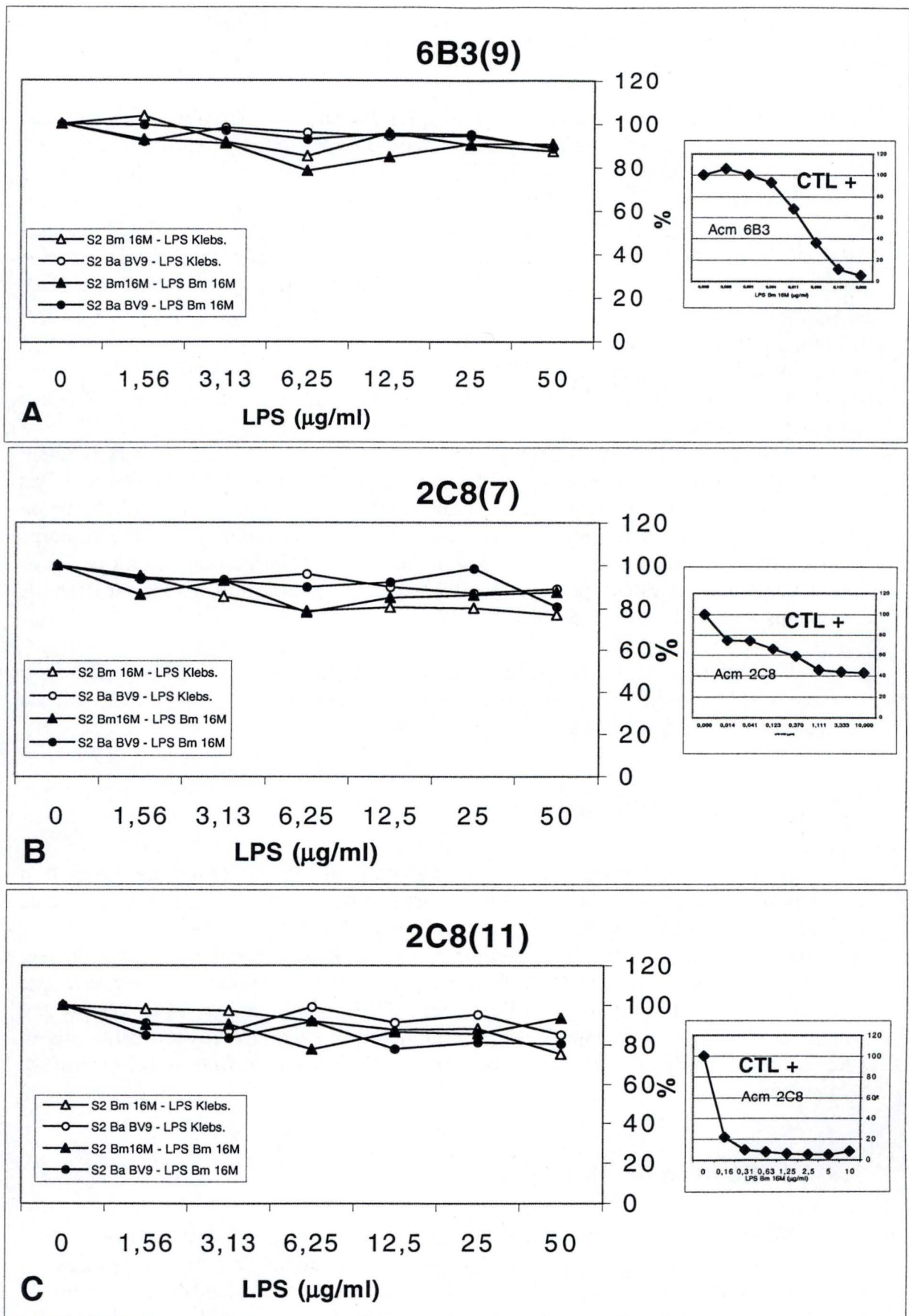
## 7.2. ELISA de déplacement

Il est possible que les anticorps dirigés contre le LPS soient représentés en trop grand nombre et que de ce fait, il est impossible de tous les inhiber avec les quantités de LPS utilisées. Nous avons par la suite modifié le protocole de l'ELISA en incubant les sera sur les mimotopes puis en lavant cinq fois pour éliminer tous les anticorps du sera en surplus (Figure 27, annexe 3). Nous avons ensuite ajouté l'inhibiteur en espérant que celui-ci "déplace" les anticorps fixés sur les différents mimotopes. Mais à nouveau, aucune différence n'a été observée entre les anticorps du sera incubés et ensuite mis en présence avec le LPS de *Klebsiella pneumoniae* et de *Brucella melitensis* 16M (résultats non montrés).

## 7.3. Vérification de l'inhibition

Nous avons réalisé également un autre contrôle afin de vérifier la possibilité d'inhiber les anticorps spécifiques du LPS avec les quantités de LPS que nous avons utilisées. Nous avons réalisé un ELISA indirect où nous avons adsorbé une quantité de LPS de *Brucella melitensis* 16M qui permettait de "retenir" la même quantité d'anticorps du sera que celle obtenue sur les peptides mimotopes (c'est-à-dire une DO équivalente) (Figure 28, annexe 3). Par la suite, nous sommes venus avec une quantité égale de LPS. Nous pouvons observer que dans ce cas, nous observons bien une inhibition des sera S2 Bm 16M et S2 Ba BV9 par le LPS de *Brucella melitensis* 16M et



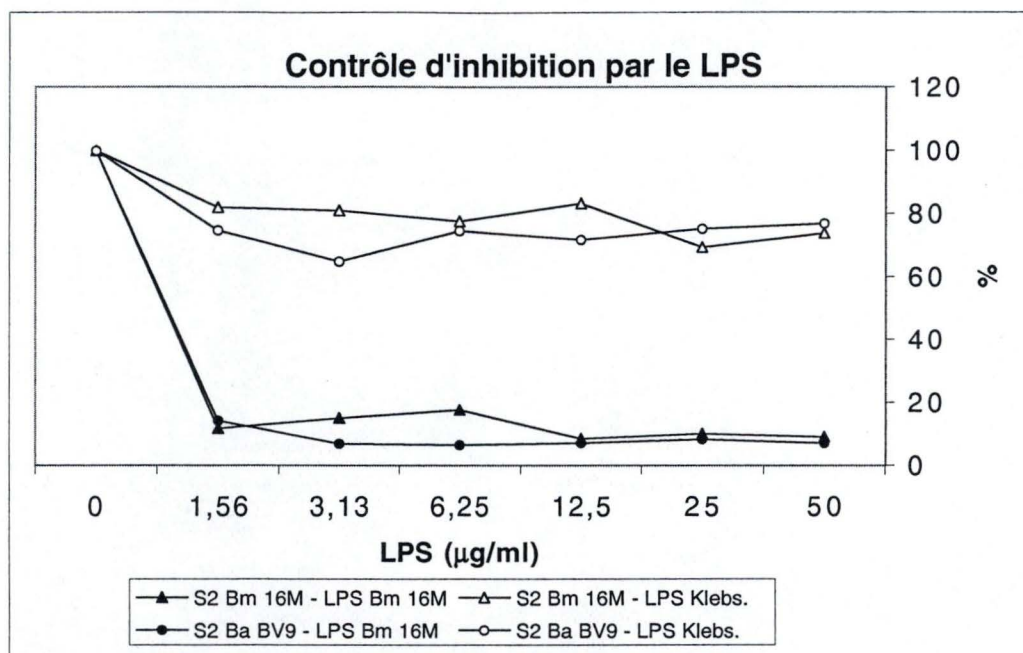


**Figure 20:** ELISA d'inhibition avec le LPS. A. Inhibition sur le mimotope 6B3(9). B. Inhibition sur le mimotope 2C8(7). C. Inhibition sur le mimotope 2C8(11). L'abscisse reprend les concentrations de LPS utilisées. L'ordonnée présente le pourcentage du signal sans inhibiteur. Les sera des souris infectées par *Brucella melitensis* 16M et *Brucella abortus* biovar 9 (en pool, 5 semaines post-infection, S2) ont été testés avec le LPS de *Brucella melitensis* 16M ainsi qu'avec le LPS de *Klebsiella pneumoniae* (contrôle négatif). Pour chaque peptide, un contrôle positif a été réalisé avec l'anticorps monoclonal.



pas par le LPS de *Klebsiella pneumoniae* (Figure 21). En ajoutant 1,56 µg/ml de LPS de *Brucella melitensis* 16M aux sera S2 Bm 16M et S2 Ba BV9, le signal chute à 10 %. Lorsque nous ajoutons une quantité égale du LPS de *Klebsiella pneumoniae* au sera Bm 16M et Ba BV9, le signal ne chute qu'aux alentours de 70-80 %. Si nous ajoutons des quantités croissantes de LPS, nous n'observons pas de diminution du signal. Il semble donc qu'avec 1,56 µg/ml de LPS de *Brucella melitensis* 16M, tous les anticorps spécifiques du LPS sont inhibés. Les quantités de LPS qui ont été utilisées avec succès dans cet ELISA sont donc suffisantes pour inhiber l'interaction de la même quantité d'anticorps que dans l'ELISA présenté au point 3.1.

Par ces différents ELISA, nous ne sommes pas parvenu à montrer que les anticorps fixés sur les mimotopes sont spécifiques de la chaîne O de *Brucella*. Il est donc possible qu'il s'agisse d'anticorps dirigés contre des protéines de *E. coli* qui contaminent les préparations de phage.



**Figure 21:** ELISA d'inhibition avec le LPS sur le LPS. Les différentes concentrations de LPS utilisées pour inhiber sont représentées en abscisse et le pourcentage du signal sans inhibiteur l'est en ordonnée. Les sera des souris infectées par *Brucella melitensis* 16M et par *Brucella abortus* biovar 9 (5 semaines post-infection, en pool) ont été testés avec le LPS de *Brucella melitensis* 16M ainsi qu'avec le LPS de *Klebsiella pneumoniae* (contrôle négatif).



**CONCLUSIONS  
ET  
PERSPECTIVES**

## Conclusions et perspectives

L'objectif de ce mémoire était de caractériser la reconnaissance de peptides mimotopes de la chaîne O du LPS de *Brucella* par des sera de souris infectées expérimentalement par différentes souches de *Brucella* et de *Yersinia enterocolitica* O:9, une bactérie responsable de réactions croisées dans le diagnostic de routine.

N'ayant pas obtenu de sérum positif avec les souris infectées par *Brucella abortus* 544 et *Yersinia enterocolitica* O:9, nous n'avons pas pu étudier l'utilisation des mimotopes pour discriminer ces deux bactéries des autres. Nous nous sommes donc focalisés sur la caractérisation de la reconnaissance de huit mimotopes de la chaîne O du LPS par des sera de souris infectées par *B. melitensis* 16M et *B. abortus* biovar 9.

Nous avons montré que les sera de souris infectées par *B. melitensis* 16M et *B. abortus* biovar 9 donnaient un signal sur six des huit mimotopes présentés à la surface de phage. Ces mêmes mimotopes ne sont pas reconnus par des sera de souris non infectées, ce qui semble indiquer que des anticorps anti-mimotopes ont été induits lors des infections par *Brucella*. De plus, les sera des souris infectées par *Brucella* ne reconnaissent pas le mimotope 70-27 qui mime une structure externe de *Neisseria meningitidis*. De manière inattendue, les sera des souris infectées par les souches M dominantes (*B. melitensis* 16M et *B. abortus* biovar 9) reconnaissent aussi bien les mimotopes sélectionnés avec les anticorps monoclonaux 2C8 (spécifique de l'épitope A) et 6B3 (M dominant).

Par la suite, un ELISA de compétition avec l'anticorps monoclonal a montré que les sera de souris infectées par *B. melitensis* 16M et *B. abortus* biovar 9 reconnaissent spécifiquement le mimotope 33c puisque les sera étaient capables d'empêcher la liaison de l'anticorps monoclonal à sa cible. Cependant, nous n'avons pas pu reproduire ces résultats avec les autres couples mimotopes-anticorps monoclonaux, ce qui pourrait indiquer que le signal obtenu en ELISA indirect avec les sera de souris infectées ne proviendrait pas d'une reconnaissance du peptide mimotope. Ces données pourraient expliquer les résultats observés sur les mimotopes sélectionnés avec l'anticorps monoclonal 2C8 avec les sera des souris infectées par des souches de *Brucella* M dominantes.

Finalement, l'interaction entre le mimotope 33c et les sera de souris infectées par *B. melitensis* 16M et *B. abortus* biovar 9 n'est pas inhibé par le LPS. Ce résultat est paradoxal puisque nous avons montré que l'interaction entre le mimotope 33c et l'anticorps monoclonal 12B12 était inhibé par le LPS et que les anticorps des sera de souris infectées par *Brucella* peuvent déplacer l'anticorps monoclonal 12B12 du mimotope 33c.

Il semble donc que le mimotope 33c soit le mimotope le plus intéressant de tous ceux que nous avons testés. Il serait intéressant d'étudier la réactivité de sera pour les autres mimotopes appartenant au même consensus que le mimotope 33c. Evidemment, des sera de souris infectées par *Yersinia enterocolitica* O:9 sont nécessaires pour



évaluer son utilisation dans un test de diagnostic discriminatoire. Le mimotope 33c mime l'épitope C, spécifique aux *Brucella*, rendant ainsi possible la discrimination.

Cependant, nous avons émis l'hypothèse de contamination des préparations de phage. Elle peut être vérifiée en utilisant les mimotopes synthétisés chimiquement dans un ELISA indirect où ils seraient couplés par de liens covalents au support. De cette manière, le bruit de fond anti-*E.coli* des sera serait éliminé et nous observerions plus que le signal contre le mimotope. Une autre possibilité serait d'utiliser un contrôle d'infection supplémentaire. Au lieu d'utiliser des sera de souris non infectées, nous pourrions infecter des souris avec une souche de *Brucella* Rough (LPS sans chaîne O). La souris développerait une réponse immunitaire suite à cette infection mais sans aboutir à la production d'anticorps dirigés contre la chaîne O de *Brucella*. Si dans ce cas, aucune différence n'apparaît entre les sera des souris infectées par une souche rough et les sera des souris PBS, nous aurons la preuve que l'infection n'augmente pas le bruit de fond contre *E.coli*. Par contre, si la reconnaissance de mimotopes n'est pas spécifique et est induite par un « boost » du système immunitaire de l'hôte suite à l'infection, les signaux des sera obtenus avec une souche Rough seront comparables à ceux obtenus avec les sera des souris infectées par les souches lisses de *Brucella*.

Une autre alternative serait de réaliser un Western Blot sur les différentes préparations de phages. Les sera y seraient incubés et révélés. Si des anticorps spécifiques des mimotopes sont présents dans les sera, il apparaîtra une bande spécifique de la taille de la pVIII recombinante du phage.

Cependant, il est également possible que les anticorps monoclonaux ayant servis à la sélection des mimotopes ne soient pas représentatifs des anticorps majoritairement produits lors d'une infection par *Brucella*. Dès lors, les mimotopes résultant de cette sélection sont peu reconnus par les différentes souris. Le séquençage de nombreux anticorps monoclonaux contre la chaîne O pourrait nous éclairer sur les idiotypes fréquemment produits suite à une infection par *Brucella*. Nous ne prendrions alors que les anticorps monoclonaux les plus représentatifs pour une sélection de nouveaux mimotopes.

La sélection de mimotopes avec des sera d'animaux atteints de brucellose est une autre alternative à celle utilisant des anticorps monoclonaux. Une première sélection avec les sera positifs suivie de sélections avec les sera positifs et d'épuisement avec des sera négatifs aboutirait à l'obtention de peptides mimotopes reconnus par un maximum de sera positifs et pas de sera négatifs. Cette sélection devrait aboutir à des mimotopes d'épitopes immunodominants, reconnus par une majorité des anticorps induits suite à une infection par *Brucella*.

# **MATERIEL ET METHODES**



# Matériel et méthodes

## 1. Infection de souris

Afin d'obtenir des sera anti-*Brucella*, des souris BALB/c âgées de 7 semaines sont infectées avec différentes souches de *Brucella* (8 souris par souche) [49-52]. Des souris BALB/c ont été également infectées par *Yersinia enterocolitica* O:9, et ce, via trois voies d'entrées différentes (intra-péritonéale, intra-gastrique et intramusculaire) [45, 46].

### Souches bactériennes utilisées :

*Brucella abortus* 544  
*Brucella abortus* biovar 9  
*Brucella melitenis* 16M  
*Yersinia enterocolitica* O:9

### Méthode:

#### 1.1. *Yersinia enterocolitica* O:9

##### 1.1.1. Vérification de la présence du plasmide de virulence

La présence du plasmide de virulence est vérifiée par un test de dépendance au calcium ainsi que l'absorption du Rouge Congo [53-55].

- Etaler la souche à tester sur 2 boîtes MOX-RC.
- Incuber deux jours à 28°C.
- Le lendemain, mettre une boîte à 37°C, l'autre reste à 28°C.

Les colonies blanches sont négatives. Les souches possédant le plasmide pYV (plasmid *Yersinia* virulence) produisent des petites colonies rouges en plus des grandes colonies sans coloration, celles-ci étant dues à la perte rapide du plasmide in vitro. La boîte restée à 28°C sert de contrôle pour la coloration.

##### 1.1.2. Préparation des doses infectantes

- J -1, ensemencer une culture de *Yersinia enterocolitica* O:9 portant le plasmide de virulence pYV dans du TSB contenant de l'ampicilline et incuber une nuit à 28°C sous agitation.
- J 0, centrifuger la culture 15 minutes à 4000 rpm (Jouan CR412) à température ambiante.
- Resuspendre le culot dans du PBS (Phosphate Buffered Saline).
- Mesurer la DO (densité optique) à 600 nm au spectrophotomètre (une DO de 1 correspond à  $3.10^8$  bactéries/ml)

### 1.1.3. Infection des souris

#### Intra-péritonéal (IP)

- Injecter 100 µl contenant  $10^6$  bactéries dans la cavité intra-péritonéale de chaque souris.

#### Intra-gastrique (IG)

- Priver les souris de nourriture et d'eau durant les 4 heures précédant l'infection.
- Administrer 30 µl de tampon carbonate  $\text{NaHCO}_3$  10 % par voie orale à chaque souris dans le but de neutraliser l'acidité de l'estomac.
- 30 minutes plus tard, à l'aide d'une canule, introduire 100 µl contenant  $10^6$  bactéries dans l'estomac.

#### Intra-musculaire (IM)

- Injecter 50 µl contenant  $10^6$  bactéries dans le muscle de la cuisse.

### 1.1.4. Dilutions sériées et comptage des doses infectantes

- Effectuer des dilutions successives des doses infectantes.
- Etaler 20 µl de chaque dilution sur milieu solide TSA avec ampicilline et incubé deux jours à 28°C.
- Compter le nombre de colonies (CFU, colony forming unit) obtenues pour chaque dilution, et évaluer le nombre de bactéries de la dose infectante.

## 1.2. *Brucella*

### 1.2.1. Préparation des doses infectantes

- J-1,ensemencer 5 ml de milieu 2YT contenant de l'acide nalidixique (Nal) et incubé une nuit sous agitation à 37°C.
- Centrifuger les cultures à 3000 rpm (Jouan CR412) pendant 15 minutes à température ambiante.
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 5 ml de PBS.
- Mesurer les DO à 600 nm au spectrophotomètre (une DO de 1 correspond à  $3.10^9$  bactéries/ml), et réaliser des dilutions adéquates des suspensions de bactéries afin d'obtenir une concentration de  $5.10^6$  bactéries/ml.

### 1.2.2 . Infection des souris

- Injecter 100 µl contenant  $5.10^5$  bactéries dans la cavité intra-péritonéale de chaque souris.



### 1.2.3. Dilutions sériées et comptage des doses infectantes

- Effectuer des dilutions successives des doses infectantes.
- Étaler 20 µl de chaque dilution sur milieu 2YT solide et incubé 3-4 jours à 37°C.
- Compter le nombre de CFU obtenues pour chaque dilution, et évaluer le nombre de bactéries de la dose infectante.

### 1.3. Récupération des sera

- Après 2, 5 et 8 semaines, réaliser une saignée rétro-orbitale sur chaque souris.
- Laisser les sera quelques heures à température ambiante et ensuite les centrifuger 5 minutes à 6000 rpm (Eppendorf, Centrifuge 5415D).
- Récupérer les surnageants.
- Répéter l'étape de centrifugation et de récupération des surnageants.
- Ajouter 1 volume de glycérol 80 % et 5 µl de PBS-azide de sodium 2% à chaque surnageant.
- Conserver à -20°C.

### 1.4. Récupération des rates

- Broyer les rates dans des sachets en plastique et resuspendre les broyats dans 2 ml de PBS Triton.
- Effectuer des dilutions sériées des broyats de rates, et étaler 20 µl de chaque dilution sur milieu 2YT solide et incubé 3-4 jours à 37°C.
- Compter le nombre de CFU obtenues pour chaque dilution, et évaluer le nombre de bactéries par rate.

#### Matériel :

- PBS 10x, 1 litre: 14 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Vel, Leuven, Belgium), 80 g NaCl (Sigma, Seelze, Germany), 2g KCl, 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O ; dissoudre et ajuster le pH à 7.4.
- PBS Triton : PBS ; Triton (Vel, Leuven, Belgium) 1/1000 (m/v), la solution est autoclavée.
- PBS-azide de sodium (Merck, Darmstadt, Germany) 2% (m/v)
- NaHCO<sub>3</sub> (Vel, Leuven, Belgium) 10% (m/v)
- Glycérol (Vel, Leuven, Belgium)
- Milieu MOX (Magnésium Oxalate), pour 1L : 40 g Tryptic Soy Agar (Remel, Lenexa KS 66215) ; 3 g extrait de levure; 2.6 g Oxalate de sodium (Merck, Darmstadt, Germany); 4.07 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (Vel, Leuven, Belgium) à filtrer et ajouter après autoclavage.
- Milieu MOX-RC (Magnésium Oxalate Red-Congo) : 400 ml de MOX ; 2 ml de rouge congo (1%) (Sigma, St-Louis, USA) autoclavé ; 8 ml de D-galactose (Sigma, St-Louis, USA) (10%) filtré.
- Milieu 2YT solide : peptone 16 g/l ; extrait de levure 10 g/l ; NaCl 5 g/l ; Agar 13 g/l
- Milieu 2YT liquide : idem 2YT solide sans Agar

- Milieu TSA (Tryptic Soy Agar, Remel, Lenexa KS 66215)
- Milieu TSB (Tryptic Soy Broth, Remel, Lenexa KS 66215)
- Ampicilline 100 µg/ml (Roche, Mannheim, Germany), acide nalidixique 25 µg/ml (Sigma, St-Louis, USA)

### 1.5. Test au cristal violet

Cette technique permet de différencier visuellement les colonies bactériennes lisses ou rugueuses (White, 1951).

Verser le cristal violet (Merck Darmstadt Germany) sur la boîte de milieu 2YT contenant les colonies à tester et une souche rugueuse comme contrôle ; laisser agir 2 minutes. Les bactéries lisses se différencient des rugueuses par un anneau incolore bordant les colonies.

### 1.6. Coloration de GRAM

Cette technique permet de différencier une bactérie à Gram négatif d'une bactérie à Gram positif. Elle est basée sur la capacité de la bactérie à retenir la safranine après dénaturation (capacité conférée par la présence ou non d'une membrane externe).

#### Méthode :

1. Sur une lame de verre, mettre une goutte d'eau
2. Toucher une colonie avec un cure-dents stérile et la déposer sur l'eau
3. Sécher à la flamme
4. Ajouter de l'alcool et passer à la flamme
5. Ajouter le cristal violet sur la lame et attendre 1 minute
6. Ajouter le lugol et attendre 1 minute
7. Ajouter de l'alcool (dénaturation)
8. Rincer à l'eau
9. Ajouter la safranine et attendre 1 minute
10. Sécher la lame en tapotant avec un papier absorbant

Si les bactéries sont rouges, ils s'agit de bactéries à Gram négatif ; les bactéries bleues sont quant à elles à Gram positif.

#### Matériel :

- Lugol (Merck, Darmstadt, Germany)
- Cristal violet (Merck, Darmstadt, Germany)
- Safranine (Merck, Darmstadt, Germany)
- Norvanol (Vel, Leuven, Belgium)
- H<sub>2</sub>O



## **2. Production de phages et évaluation de la quantité de phages produits**

### **2.1. Préparation de phages (Système phagemide) : vecteur pC89**

#### Méthode :

1. Préculture : Ensemencer 5 ml de milieu LB (ampicilline 100 µg/ml, streptomycine 30 µg/ml) à partir d'une colonie de DH11S transformée par le plasmide pC89 contenant la séquence du peptide. Après une nuit de croissance, mesurer la densité optique à 600 nm de la préculture.
2. Culture : Utiliser la préculture pour ensemencer 400 ml de milieu LB, (ampicilline 100 µg/ml, streptomycine 30 µg/ml) telle que la DO initiale à 600 nm soit de 0,05. La culture se fait dans un Erlenmeyer à contre-pales de 2 litres.
3. Lorsque la DO à 600 nm est entre 0.2 et 0.3, stopper la culture durant 15 minutes (reconstitution des pili, indispensable à la surinfection) puis surinfecter avec du phage helper M13K07 à raison de 20 phages par bactérie (On estime que le concentration de bactérie à une DO à 600 nm de 1 est de  $3 \cdot 10^8$  bactéries/ml)
4. Agiter la culture lentement à 37 °C pendant 15 minutes
5. Ajouter l'IPTG à une concentration finale de 1 mM.
6. Agiter vigoureusement à 37°C pendant toute une nuit.
7. Précipitation des phages à partir du surnageant de culture :
  - Centrifuger la culture à température ambiante à 4500 rpm (Beckman J2-21 E1004 JA 10) durant 30 minutes.
  - Ajouter au surnageant 0,15 volume de PEG 6000 NaCl (stérile et stocké à 4°C) et mélanger. Laisser à 4°C durant une nuit.
  - Centrifuger à 4500 rpm (Beckman J2-21 E1004 JA 10) à 4°C pendant 30 minutes.
  - Resuspendre le culot dans 0,15 volume de PBS-azide de sodium 0,05% stérilisé par filtration (MILLEX<sup>R</sup>-GP, 0,22 µm, MILLIPORE).
  - Centrifuger à température ambiante à 2000 rpm (Jouan CR412), durant 10 minutes. Récupérer le surnageant.
  - Ajouter au surnageant 0,15 volume de Peg 6000-NaCl (stocké à 4°C) et laisser à 4°C durant une nuit.
  - Centrifuger à 4°C, 4300 rpm (Jouan CR412) durant 30 minutes.
  - Resuspendre le culot dans 5 ml de PBS-azide de sodium 0.02 %.
  - Incuber à 65°C durant 20 minutes. Centrifuger à 6000 rpm (Jouan CR412) durant 10 minutes. Récupérer le surnageant qui constitue la préparation de phages.
  - Ajouter du glycérol 80% stérile.
  - Conserver à -20°C.

## 2.2. Préparation de phages (Système phage) : vecteur Fd Tet

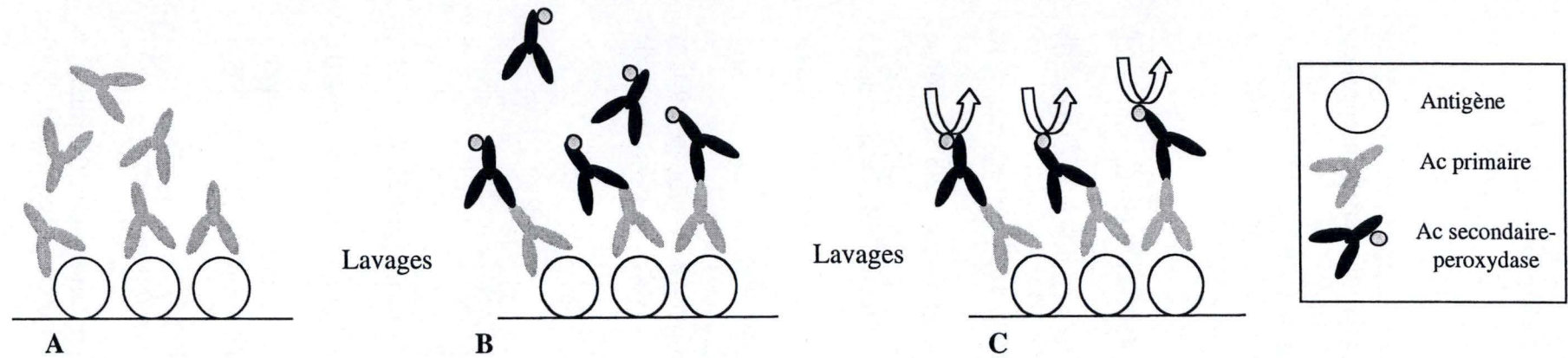
### Méthode :

1. Préculture : Ensemencer 5 ml de milieu LB (kanamycine 50 µg/ml, tétracycline 20 µg/ml) à partir d'une colonie de K91Kan infectée. Après une nuit de croissance, mesurer la densité optique à 600 nm de la préculture.
2. Culture : Utiliser la préculture pour ensemencer 400 ml de milieu LB (kanamycine 50 µg/ml, tétracycline 20 µg/ml) telle que la DO initiale à 600 nm soit de 0,05. La culture se fait dans un Erlenmeyer à contre-pales de 2 litres.
3. Agiter à 37 °C, jusqu'à une DO à 600 nm de 1,5-2,5.
4. Précipitation des phages :
  - Centrifuger la culture à température ambiante à 4500 rpm (Beckman J2-21 E1004 JA 10) durant 30 minutes.
  - Ajouter au surnageant 0,15 volume de PEG 6000-NaCl (stérile et stocké à 4°C) et mélanger. Laisser une nuit à 4°C.
  - Centrifuger à 4500 rpm (Beckman J2-21 E1004 JA 10) à 4°C pendant 30 minutes.
  - Resuspendre le culot dans 0,15 volume de PBS-azide de sodium 0,05 % stérilisé par filtration (MILLEX<sup>R</sup>-GP, 0,22 µm, MILLIPORE).
  - Centrifuger à température ambiante à 2000 rpm (Jouan CR412), durant 10 minutes. Récupérer le surnageant.
  - Ajouter au surnageant 0,15 volume de PEG 6000-NaCl (stocké à 4°C) et laisser à 4°C durant 5 heures.
  - Centrifuger à 4000 rpm (Jouan CR412) à 4°C durant 30 minutes.
  - Resuspendre le culot dans 200 µl de PBS-azide de sodium 0,05 %.
  - Incuber à 65°C durant 20 minutes. Centrifuger à 6000 rpm (Jouan CR412) durant 10 minutes. Récupérer le surnageant qui constitue la préparation de phages.
  - Ajouter du glycérol 80% stérile.
  - Conserver à -20°C.

### Matériel:

- Cellules K91KAN, génotype : HfrC, T2R, RelA, pit-10, SpoT1, tonA22, ompF627, phoA4, lambda LacZ :: KanR.
- Cellules DH11S, génotype : F', mcrA, Δ(mrr hsdRMS mcrBC), Δ(lac-proAB), Δ(recA1398), deoR, rpsL, srl, thi, F'proAB<sup>+</sup>.
- PEG NaCl : 100 g PEG (PolyEthylène Glycol, Jansens Chimica, Belgium) 6000 ; 116 g NaCl et 475 ml H<sub>2</sub>O milliQ. Stériliser par autoclavage, mélanger régulièrement lors du refroidissement.
- PBS-azide de sodium (Merck, Darmstadt, Germany) 0,05 %
- Phage helper M13k07 (Amersham Biosciences, Roosendaal, Netherland)
- Glycérol (Vel, Leuven, Belgium)
- IPTG (Isopropyl-thio beta D thiogalactoside) (Eurogentec, Sart-Tilman, Belgium)
- Milieu LB (Invitrogen, Scotland) : 10 g/l tryptone, 5 g/l d'extrait de levure, 5 g/l NaCl, H<sub>2</sub>O.





**Figure 22: ELISA indirect.** A. Incubation de l'anticorps primaire sur la surface sensibilisée avec l'antigène.  
 B. Incubation de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase. C. Révélation par ajout du substrat de la peroxydase.

- Milieu Terrific Broth (pour 1 l) : 900 ml H<sub>2</sub>O ; 12 g tryptone ; 24 g d'extrait de levure ; 4 ml de glycérol, à autoclaver et ajouter 100 ml de tampon phosphate de potassium autoclavé séparément.
- Ampicilline (Roche, Mannheim, Germany) (100 µg/ml) ; Streptomycine (Sigma, Deisenhofen, Germany) (30 µg/ml) ; Kanamycine (Sigma, St-Louis, USA) (50 µg/ml) ; Tétracycline (Boehringer, Mannheim, Germany) (20 µg/ml)

## 2.3. Évaluation du nombre de particules phagiennes

L'évaluation du nombre de particules phagiennes se fait en déterminant l'absorbance à 269 nm de la solution contenant les phages.

### Méthode:

- Mesurer l' $A_{320}$ , l' $A_{269}$  pour les préparations de phages diluées 10X dans du PBS-azide de sodium 0,02%.
- Le nombre de particules phagiennes par unité de volume est calculé grâce à la formule :  
 $(A_{269} - A_{320}) \times 10/1,5 \times 10^{13}$  phages/ml = nombre de phages/ml ; en sachant que une DO de 1,5 à 269 nm correspond à  $10^{13}$  phages/ml.

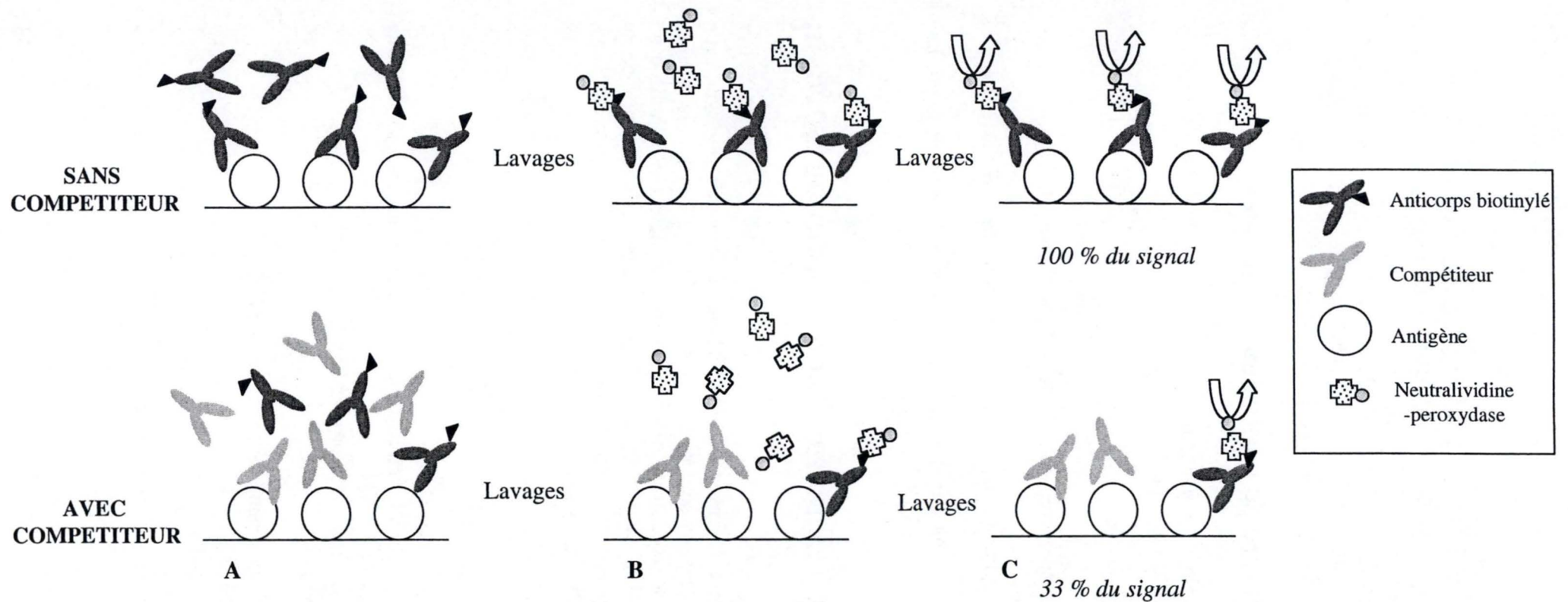
## 3. ELISA indirect (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Cette technique permet de mesurer l'intensité de la reconnaissance entre un anticorps et son antigène. Les puits sont sensibilisés avec les antigènes puis incubés avec l'anticorps primaire. La fixation de celui-ci est ensuite détectée à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. Une réaction enzymatique de la peroxydase avec un chromogène permet finalement de visualiser la liaison du conjugué, et donc de l'anticorps primaire (Figure 22).

### Méthode:

1. Adsorption de l'antigène:
  - Déposer un volume de 100 µl contenant les antigènes à tester dans les puits d'une plaque Maxisorp.
  - Incuber à 37°C durant 2 heures, ou une nuit à 4°C.
  - Eliminer le contenu des puits.
2. Saturation :
  - Ajouter 300 µl de PBS additionné de lait en poudre (5 %)
  - Incuber à 37°C durant 2 heures.
  - Eliminer le contenu des puits.
3. Incubation avec l'anticorps :
  - Ajouter un volume de 100 µl par puits de solution de l'anticorps primaire, dans une solution de PBS-lait 1 %.





**Figure 23: ELISA de compétition.** A. Incubation de l'anticorps biotinylé avec ou sans compétiteur sur la surface sensibilisée avec l'antigène. B. Incubation de la neutralividine couplée à la peroxydase. C. Révélation par ajout du substrat de la peroxydase. En absence de compétiteur, l'anticorps biotinylé est le seul à se fixer sur l'antigène. Le signal est considéré comme 100 %. Le signal diminue lorsque les deux anticorps sont en compétition pour le même épitope.

- Incuber à 37°C durant 1 heure.
- Eliminer le contenu des puits.
- 4. Lavages :
  - Déposer dans chaque puits un volume de 300 µl d'une solution de PBS et de Tween 0.05 %.
  - Jeter le contenu des puits et répéter le lavage quatre fois.
- 5. Incubation avec l'anticorps secondaire :
  - Ajouter un volume de 100 µl par puits de solution d'un polyclonal de chèvre anti-anticorps de souris couplé à la peroxydase (GAM-HRP) dans une solution de PBS-lait 1 %.
  - Incuber à 37°C durant 1 heure.
  - Eliminer le contenu des puits.
- 6. Lavages : Répéter l'étape 4.
- 7. Révélation :
  - Ajouter 100 µl de K-blue et incuber à température ambiante durant 15 minutes à l'obscurité.
  - Ajouter 25 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N dans chaque puits.
  - Mesurer la DO à 450-630 nm sur lecteur de plaque.

Matériel :

- Plaque Maxisorp<sup>TM</sup> surface (NUNC-Immuno<sup>TM</sup> Plate, Brand Products).
- PBS lait en poudre (Gloria, Nestlé) 5 % (m/v)
- PBS Tween 20 (Merck) 0.05 % (m/v)
- Polyclonal de chèvre anti-anticorps de souris couplé à la peroxydase, GAM-HRP (Dako, Denmark)
- K-blue (Neogen, Lexington, KY 40305)
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N (Vel, Leuven, Belgium)
- Lecteur de plaques (EL-340, Bio-Tek Instruments)

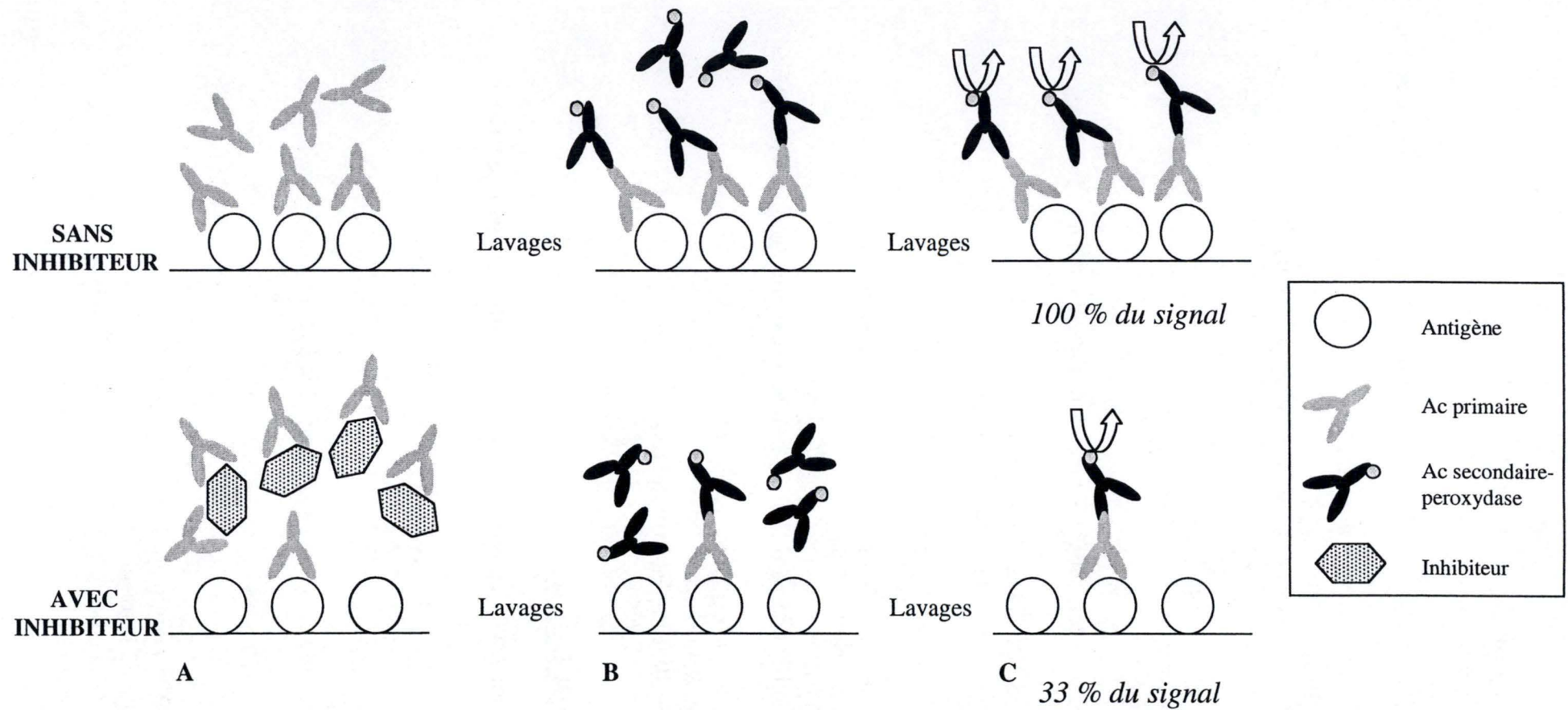
## **4. ELISA de compétition**

Cet ELISA met en évidence la compétition entre des anticorps pour un même épitope (Figure 23).

Méthode:

1. Adsorption de l'antigène:
  - Déposer un volume de 100 µl contenant l'antigène à tester dans les puits d'une plaque Maxisorp.
  - Incuber à 37°C durant 2 heures, ou une nuit à 4°C.
  - Eliminer le contenu des puits.
2. Saturation :
  - Ajouter 300 µl de PBS additionné de lait en poudre 5 %
  - Incuber à 37°C durant 2 heures.
  - Eliminer le contenu des puits.





**Figure 24:** ELISA d'inhibition. A. Incubation de l'anticorps primaire avec ou sans inhibiteur sur la surface sensibilisée avec l'antigène. B. Incubation de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase. C. Révélation par ajout du substrat de la peroxydase. Le signal observé sans inhibiteur est considéré comme 100 %. Lorsque l'anticorps primaire est préalablement incubé avec l'inhibiteur et déposé sur l'antigène, le signal est diminué.

3. Préparation du mix anticorps primaire-compétiteur
  - Diluer le compétiteur dans une solution de lait en poudre 1% contenant déjà l'anticorps primaire.
4. Incubation avec le mix anticorps primaire-compétiteur
  - Ajouter un volume de 100 µl par puits du mélange contenant différentes dilutions de compétiteur et d'anticorps primaire PBS-lait 1 % et de l'anticorps primaire PBS-lait 1% sans compétiteur.
  - Incuber à 37°C durant 1 heure.
  - Eliminer le contenu des puits.
5. Lavages : idem ELISA indirect
6. Incubation avec la neutralividine couplée à la peroxydase :
  - Ajouter un volume de 100 µl par puits de neutralividine couplé à la peroxydase dans une solution de PBS-lait 1 %.
  - Incuber à 37°C durant 1 heure.
  - Eliminer le contenu des puits.
7. Lavages : idem ELISA indirect
8. Révélation : idem ELISA indirect

Matériel :

- Plaque Maxisorp<sup>TM</sup> surface (NUNC-Immuno<sup>TM</sup> Plate, Brand Products).
- PBS lait en poudre (Gloria, Nestlé) 5 % (m/v)
- PBS Tween 20 (Merck) 0.05 % (m/v)
- Polyclonal de chèvre anti-anticorps de souris couplé à la peroxydase, GAM-HRP (Dako, Denmark)
- K-blue (Neogen, Lexington, KY 40305)
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N (Vel, Leuven, Belgium)
- Lecteur de plaques (EL-340, Bio-Tek Instruments)
- Neutralividine (Belovo, Bastogne, Belgium)

## **5. Inhibition**

L'ELISA d'inhibition informe sur la parenté antigénique de l'antigène adsorbé et de l'inhibiteur (figure 24).

Méthode :

1. Adsorption de l'antigène:
  - Déposer un volume de 100 µl contenant l'antigène à tester dans les puits d'une plaque Maxisorp.
  - Incuber à 37°C durant 2 heures ou une nuit à 4°C.
  - Eliminer le contenu des puits.
2. Saturation :
  - Ajouter 300 µl de PBS additionné de lait en poudre 5 %.
  - Incuber à 37°C durant 2 heures.
  - Eliminer le contenu des puits.





3. Préparation du mix anticorps primaire - inhibiteur :
  - Diluer le LPS dans une solution de lait en poudre 1% contenant déjà l'anticorps primaire.
  - Laisser une heure à 37°C.
4. Incubation avec le mix anticorps - LPS
  - Ajouter un volume de 100 µl par puits du mélange contenant l'anticorps primaire et les différentes concentrations d'inhibiteur PBS-lait 1 %.
  - Incuber à 37°C durant 1 heure.
  - Eliminer le contenu des puits.
5. Lavages : idem ELISA indirect.
6. Incubation avec l'anticorps secondaire : idem ELISA indirect.
7. Lavages : Répéter l'étape 5.
8. Révélation : idem ELISA indirect.

Matériel :

- Plaque Maxisorp™ surface (NUNC-Immuno™ Plate, Brand Products).
- PBS lait en poudre (Gloria, Nestlé) 5 % (m/v)
- PBS Tween 20 (Merck) 0.05 % (m/v)
- Polyclonal de chèvre anti-anticorps de souris couplé à la peroxydase, GAM-HRP (Dako, Danmark)
- K-blue (Neogen, Lexington, KY 40305)
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N (Vel, Leuven, Belgium)
- Lecteur de plaques (EL-340, Bio-Tek Instruments)

## **6. Biotinylation d'anticorps**

La biotine a une affinité pour la neutralividine couplée à la peroxydase ; lors de la biotinylation, la biotine est liée de façon covalente aux groupements NH<sub>2</sub> présents sur les anticorps.

Méthode :

- Biotinylation :
  - Incuber les anticorps avec la solution de biotine-7-NHS sous agitation douce à température ambiante pendant 2 heures.
- Purification des anticorps biotinylés:
 

Les anticorps biotinylés sont séparés des biotines non liées sur un tamis moléculaire.

  - Ajouter 5 ml de solution de blocage au dessus de la colonne Sephadex G-25 et laisser couler.
  - Equilibrer la colonne avec 30 ml de PBS et laisser couler.
  - Sur les colonnes préparées, déposer le mix anticorps/biotine et laisser couler.
  - Eluer les anticorps avec du PBS (3,5 ml) et collecter les échantillons en pool de 10 gouttes.
  - Conserver les échantillons à -20°C.



Afin de déterminer les différents éluats à conserver, un ELISA indirect est réalisé sur chaque échantillon; les différents pools positifs sont alors rassemblés et la concentration en anticorps est déterminée par un dosage BCA.

Matériel :

- Colonne Sephadex G-25 (Biotin Labeling Kit, Roche, Indianapolis, USA)
- Biotin-7-NHS solution (Biotin Labeling Kit, Roche, Indianapolis, USA)
- Solution de blocage (Biotin Labeling Kit, Roche, Indianapolis, USA)
- PBS

## **7. Dosage protéique : BCA**

La méthode de dosage BCA (BCA Protein Assay Reagent Kit, Pierce, Rockford, USA) est utilisée pour évaluer la quantité d'anticorps monoclonaux après biotinylation.

Méthode :

- Diluer la BSA (Bovine Serum Albumine) de concentration stock connue (10 mg/ml) afin d'obtenir les concentrations suivantes :  
1 mg/ml ; 0.8 mg/ml ; 0.6 mg/ml ; 0.4 mg/ml ; 0.2 mg/ml ;  
0.1 mg/ml ; 0.05 mg/ml et 0 mg/ml (blanc).
- Diluer les échantillons à tester 1, 2, 4 et 8X.
- Traitement des **échantillons** et de l'étalon :
  - Ajouter à chaque dilution 200 µl du mélange de réactifs A/B suivant le rapport 50 :1
  - Incuber 30 minutes à 37°C à l'obscurité.
  - Mesurer la densité optique à 550 nm (EL-340, Bio-Tek Instruments).
- Tracer la droite étalon en plaçant sur l'axe des ordonnées les concentrations protéiques de la BSA et sur l'axe des abscisses les DO correspondantes.
- Connaissant la DO de chaque échantillon, calculer leur concentration sur base de la droite étalon.

### Matériel :

- Toutes les mesures s'effectuent dans une plaque 96 puits (NUNC-Immuno™ Plate, Brand Products).
- BSA (Sigma, St-Louis, USA): Solution stock 10 mg/ml
- Réactif BCA :
  - 1 volume de réactif B : CuSO<sub>4</sub> (BCA Protein Assay Reagent Kit, Pierce, Rockford, USA)
  - 50 volumes de réactif A : BCA protein assay reagent A (BCA Protein Assay Reagent Kit, Pierce, Rockford, USA)



# **ANNEXES**

## Annexe 1

Pour rappel, les différents biovars ont été classés en trois sérotypes ( $A^+M^-$ ,  $A^-M^+$  et  $A^+M^+$ ) sur base de leur réactivité avec des sera polyclonaux spécifiques A ou M (Tableaux 1 et 2). Comme nous allons travailler avec des mimotopes sélectionnés par des anticorps monoclonaux, nous avons vérifié que la reconnaissance des différents biovars par ces anticorps monoclonaux pouvait être corrélé avec les sérotypes.

Le tableau ci-dessous reprend la réactivité des trois anticorps monoclonaux pour la plupart des biovars de *Brucella abortus* et *Brucella melitensis* (un – signifie que l'anticorps monoclonal ne reconnaît pas la souche).

Espèces	Biovars	Sérotypes	12B12	2C8	6B3
<i>Brucella abortus</i>	1	$A^+M^-$	++	++	-
	2	$A^+M^-$	++	++	-
	3	$A^+M^-$	++	++	-
	4	$A^-M^+$	++	-	++
	5	$A^-M^+$	++	-	++
	6	$A^+M^-$	++	++	-
	7	$A^+M^+$	ND <sup>27</sup>	ND	ND
	9	$A^-M^+$	++	+	+++
<i>Brucella melitensis</i>	1	$A^-M^+$	++	-	++
	2	$A^+M^-$	++	++	-
	3	$A^+M^+$	ND	ND	ND

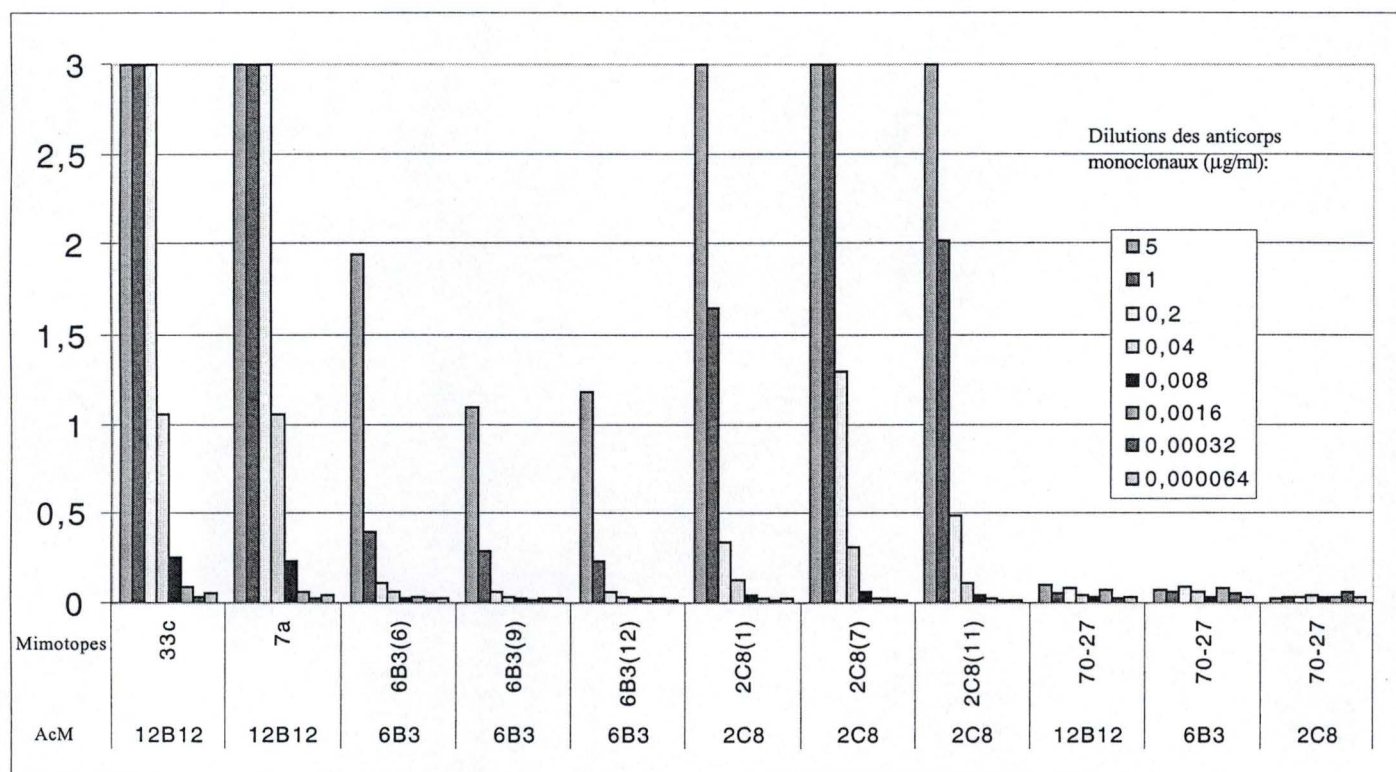
$A^+M^-$
$A^+M^+$
$A^-M^+$

Les résultats montrent que *Brucella abortus* biovar 9 ( $A^-M^+$ ) n'est pas reconnue de la même manière que les autres souches  $A^-M^+$  par les anticorps monoclonaux 2C8 et 6B3. Les différences d'affinité de ces deux anticorps monoclonaux pour *Brucella abortus* biovar 9 et les autres souches ayant le même sérotype signifieraient que les épitopes n'y sont pas représentés de la même manière, en quantité et/ou en qualité. Des mimotopes sélectionnés avec ces deux anticorps monoclonaux pourraient ne pas être reconnus de la même manière par des sera induits par ces biovars de même sérotypes. Il est donc intéressant d'adjoindre le biovar 9 au biovar représentatif du sérotype  $A^-M^+$ .

<sup>27</sup> Il eut été également intéressant de tester ces souches, cependant, nous ne disposons pas de ces bactéries au laboratoire.



## Annexe 2

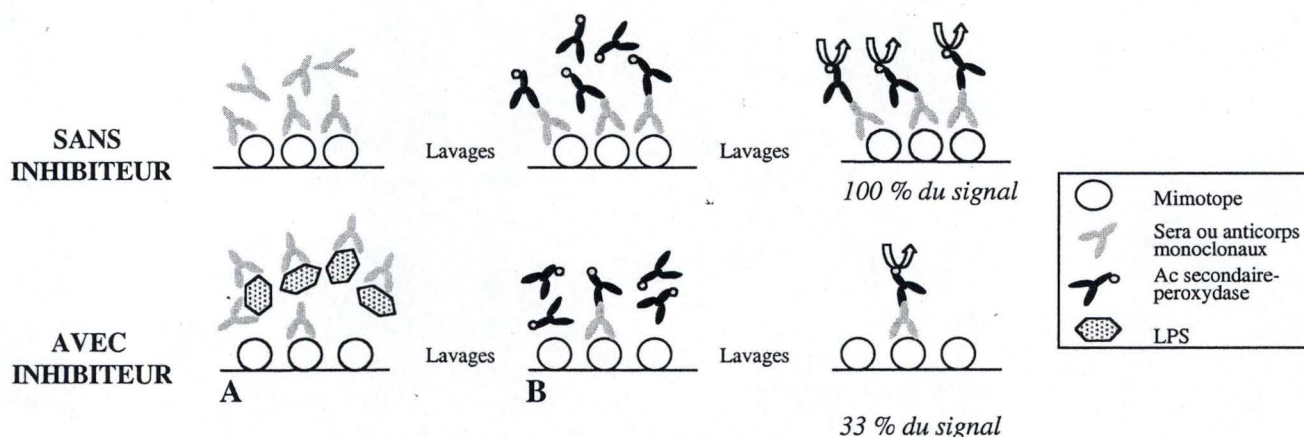


**Figure 25 :** Test des différentes préparations de phage en ELISA indirect. Les différents phages présentant les peptides ainsi que les anticorps monoclonaux (AcM) utilisés sont représentés en abscisse. L'ordonnée représente la densité optique à 450 – 630 nm. Pour chaque préparation, différentes concentrations d'anticorps monoclonaux ont été utilisées.

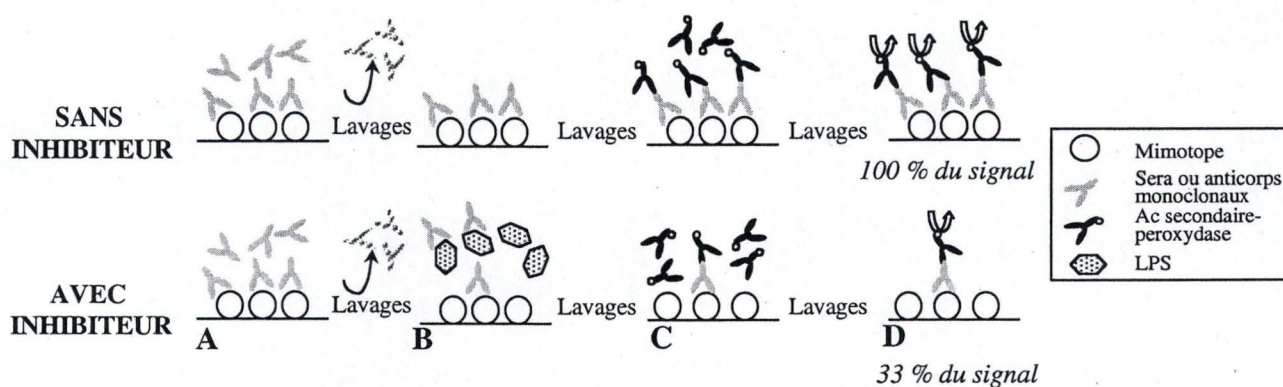
Nous pouvons voir que chaque anticorps monoclonal reconnaît ses mimotopes. L'affinité d'un anticorps monoclonal pour ses différents mimotopes varie de l'un à l'autre. Par exemple, l'anticorps monoclonal 2C8 a une meilleure affinité pour le mimotope 2C8(7) que pour les mimotopes 2C8(1) et 2C8(11). Cette différence est basée sur le fait que les interactions entre les mimotopes et l'anticorps monoclonal ne sont pas les mêmes. De plus, l'affinité de l'anticorps monoclonal 12B12 pour ses mimotopes est plus forte que celle de l'anticorps monoclonal 6B3 pour ses mimotopes.

La spécificité des mimotopes sélectionnés par les anticorps monoclonaux 2C8 et 6B3 pour leurs anticorps monoclonaux a déjà été établie [23, 43]. La spécificité des mimotopes 7a et 33c pour l'anticorps monoclonal 12B12 a été vérifiée avant ce travail (données non publiées).

# Annexe 3

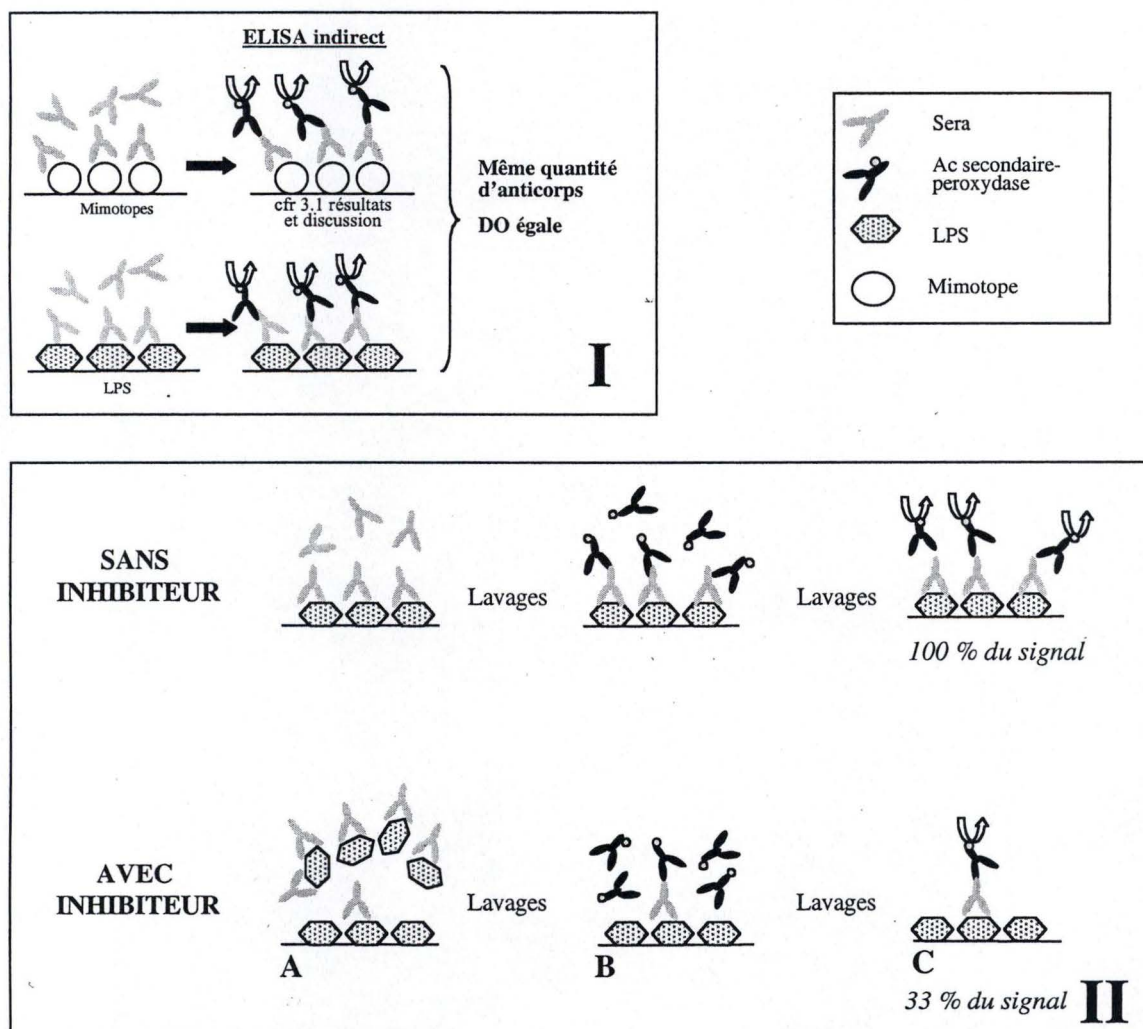


**Figure 26:** ELISA d'inhibition sur les mimotopes. A. Incubation des sera ou des anticorps monoclonaux avec ou sans LPS sur la surface sensibilisée avec les mimotopes. B. Incubation de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase. C. Révélation par ajout du substrat de la peroxydase. Le signal observé sans LPS est considéré comme 100 %. Lorsque les anticorps primaires reconnaissent les mimotopes interagissent avec le LPS, le signal diminue.



**Figure 27:** ELISA de déplacement. A. Incubation des sera sur la surface sensibilisée avec les mimotopes ensuite, lavages. B. Incubation avec le LPS, si les anticorps du sera reconnaissant les mimotopes sont des anticorps anti-LPS, ils seront partiellement « chassés » de la surface sensibilisée et éliminés lors des second lavages. C. Incubation de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase. D. Révélation par ajout du substrat de la peroxydase. Le signal observé sans inhibiteur est considéré comme 100 %.





**Figure 28:** ELISA d'inhibition sur le LPS. I. La quantité de LPS utilisée pour sensibiliser la surface correspond à celle qui retenait la même quantité d'anticorps que celle obtenue lors des ELISA sur les mimotopes (Résultats et discussion 3.1). II. A. Incubation des sera avec ou sans LPS sur la surface sensibilisée avec le LPS. B. Incubation de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase. C. Révélation par ajout du substrat de la peroxydase. Le signal observé sans LPS est considéré comme 100 %.

# **BIBLIOGRAPHIE**



## Bibliographie

1. Adams, G., *Advances in Brucellosis research*, ed. T.A.M.U. Press. 1990.
2. Moriyon, I. and I. Lopez-Goni, *Structure and properties of the outer membranes of Brucella abortus and Brucella melitensis*. Int Microbiol, 1998. **1**(1): p. 19-26.
3. Meikle, P.J., M.B. Perry, J.W. Cherwonogrodzky, and D.R. Bundle, *Fine structure of A and M antigens from Brucella biovars*. Infect Immun, 1989. **57**(9): p. 2820-8.
4. Bundle, D.R., J.W. Cherwonogrodzky, and M.B. Perry, *Structural elucidation of the Brucella melitensis M antigen by high-resolution NMR at 500 MHz*. Biochemistry, 1987. **26**(26): p. 8717-26.
5. Bundle, D.R., J.W. Cherwonogrodzky, and M.B. Perry, *The structure of the lipopolysaccharide O-chain (M antigen) and polysaccharide B produced by Brucella melitensis 16M*. FEBS Lett, 1987. **216**(2): p. 261-4.
6. Bundle, D.R., J.W. Cherwonogrodzky, M. Caroff, and M.B. Perry, *The lipopolysaccharides of Brucella abortus and B. melitensis*. Ann Inst Pasteur Microbiol, 1987. **138**(1): p. 92-8.
7. Bundle, D.R., J.W. Cherwonogrodzky, M.A. Gidney, P.J. Meikle, M.B. Perry, and T. Peters, *Definition of Brucella A and M epitopes by monoclonal typing reagents and synthetic oligosaccharides*. Infect Immun, 1989. **57**(9): p. 2829-36.
8. Diaz, R., L.M. Jones, D. Leong, and J.B. Wilson, *Surface antigens of smooth brucellae*. J Bacteriol, 1968. **96**(4): p. 893-901.
9. Alton, G.G., L.M. Jones, R.D. Angus, and J.M. Verger, *Techniques for the brucellosis laboratory*. I. 1988, Paris, France: Institut National de la Recherche.
10. Miles, W., Br. J. Exp. Pathol., 1939: p. 13,1.
11. Greiser-Wilke, I. and V. Moennig, *Monoclonal antibodies and characterization of epitopes of smooth Brucella lipopolysaccharides*. Ann Inst Pasteur Microbiol, 1987. **138**(5): p. 549-60.
12. Douglas, J.T. and D.A. Palmer, *Use of monoclonal antibodies to identify the distribution of A and M epitopes on smooth Brucella species*. J Clin Microbiol, 1988. **26**(7): p. 1353-6.
13. Cloeckaert, A., I. Jacques, R.A. Bowden, G. Dubray, and J.N. Limet, *Monoclonal antibodies to Brucella rough lipopolysaccharide: characterization and evaluation of their protective effect against B. abortus*. Res Microbiol, 1993. **144**(6): p. 475-84.
14. Vizcaino, N., A. Chordi, and L. Fernandez-Lago, *Characterization of smooth Brucella lipopolysaccharides and polysaccharides by monoclonal antibodies*. Res Microbiol, 1991. **142**(9): p. 971-8.
15. Weynants, V., D. Gilson, A. Cloeckaert, P.A. Denoel, A. Tibor, P. Thiange, J.N. Limet, and J.J. Letesson, *Characterization of a monoclonal antibody specific for Brucella smooth lipopolysaccharide and development of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay to improve the serological diagnosis of brucellosis*. Clin Diagn Lab Immunol, 1996. **3**(3): p. 309-14.
16. Cloeckaert, A., V. Weynants, J. Godfroid, J.M. Verger, M. Grayon, and M.S. Zygmunt, *O-Polysaccharide epitopic heterogeneity at the surface of Brucella*



- spp. studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. Clin Diagn Lab Immunol, 1998. **5**(6): p. 862-70.
17. Cloeckaert, A., M.S. Zygmunt, G. Dubray, and J.N. Limet, *Characterization of O-polysaccharide specific monoclonal antibodies derived from mice infected with the rough Brucella melitensis strain B115*. J Gen Microbiol, 1993. **139** (Pt 7): p. 1551-6.
  18. Weynants, V., D. Gilson, A. Cloeckaert, A. Tibor, P.A. Denoel, F. Godfroid, J.N. Limet, and J.J. Letesson, *Characterization of smooth lipopolysaccharides and O polysaccharides of Brucella species by competition binding assays with monoclonal antibodies*. Infect Immun, 1997. **65**(5): p. 1939-43.
  19. Caroff, M., D.R. Bundle, and M.B. Perry, *Structure of the O-chain of the phenol-phase soluble cellular lipopolysaccharide of Yersinia enterocolitica serotype O:9*. Eur J Biochem, 1984. **139**(1): p. 195-200.
  20. Oomen, R.P., N.M. Young, and D.R. Bundle, *Molecular modeling of antibody-antigen complexes between the Brucella abortus O-chain polysaccharide and a specific monoclonal antibody*. Protein Eng, 1991. **4**(4): p. 427-33.
  21. Rose, D.R., M. Przybylska, R.J. To, C.S. Kayden, R.P. Oomen, E. Vorberg, N.M. Young, and D.R. Bundle, *Crystal structure to 2.45 Å resolution of a monoclonal Fab specific for the Brucella A cell wall polysaccharide antigen*. Protein Sci, 1993. **2**(7): p. 1106-13.
  22. Caroff, M., D.R. Bundle, M.B. Perry, J.W. Cherwonogrodzky, and J.R. Duncan, *Antigenic S-type lipopolysaccharide of Brucella abortus 1119-3*. Infect Immun, 1984. **46**(2): p. 384-8.
  23. Mertens, P., D. Walgraffe, T. Laurent, N. Deschrevel, J.J. Letesson, and X. De Bolle, *Selection of phage-displayed peptides recognised by monoclonal antibodies directed against the lipopolysaccharide of Brucella*. Int Rev Immunol, 2001. **20**(2): p. 181-99.
  24. Bricker, B.J., *PCR as a diagnostic tool for brucellosis*. Vet Microbiol, 2002. **90**(1-4): p. 435-46.
  25. Nielsen, K., *Diagnosis of brucellosis by serology*. Vet Microbiol, 2002. **90**(1-4): p. 447-59.
  26. Omer, M.K., E. Skjerve, A.P. MacMillan, and Z. Woldehiwet, *Comparison of three serological tests in the diagnosis of Brucella infection in unvaccinated cattle in Eritrea*. Prev Vet Med, 2001. **48**(3): p. 215-22.
  27. Weynants, V., J. Godfroid, B. Limbourg, C. Saegerman, and J.J. Letesson, *Specific bovine brucellosis diagnosis based on in vitro antigen-specific gamma interferon production*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(3): p. 706-12.
  28. Rojas, N., O. Zamora, J. Cascante, D. Garita, and E. Moreno, *Comparison of the antibody response in adult cattle against different epitopes of Brucella abortus lipopolysaccharide*. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 2001. **48**(8): p. 623-9.
  29. Weynants, V., A. Tibor, P.A. Denoel, C. Saegerman, J. Godfroid, P. Thiange, and J.J. Letesson, *Infection of cattle with Yersinia enterocolitica O:9 a cause of the false positive serological reactions in bovine brucellosis diagnostic tests*. Vet Microbiol, 1996. **48**(1-2): p. 101-12.
  30. Kittelberger, R., P.G. Bundesen, A. Cloeckaert, I. Greiser-Wilke, and J.J. Letesson, *Serological cross-reactivity between Brucella abortus and yersinia enterocolitica O:9: IV. Evaluation of the M- and C-epitope antibody response for*



- the specific detection of B. abortus infections.* Vet Microbiol, 1998. **60**(1): p. 45-57.
31. Kittelberger, R., M.P. Reichel, M.A. Joyce, and C. Staak, *Serological crossreactivity between Brucella abortus and Yersinia enterocolitica 0:9. III. Specificity of the in vitro antigen-specific gamma interferon test for bovine brucellosis diagnosis in experimentally Yersinia enterocolitica 0:9-infected cattle.* Vet Microbiol, 1997. **57**(4): p. 361-71.
  32. Godfroid, J., C. Saegerman, V. Wellemans, K. Walravens, J.J. Letesson, A. Tibor, A. Mc Millan, S. Spencer, M. Sanna, D. Bakker, R. Pouillot, and B. Garin-Bastuji, *How to substantiate eradication of bovine brucellosis when aspecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing.* Vet Microbiol, 2002. **90**(1-4): p. 461-77.
  33. Geysen, H.M., *Antigen-antibody interactions at the molecular level : adventures in peptide synthesis.* Immunology today, 1985. **6**(12).
  34. Pirofski, L.A., *Polysaccharides, mimotopes and vaccines for fungal and encapsulated pathogens.* Trends Microbiol, 2001. **9**(9): p. 445-51.
  35. Monzavi-Karbassi, B., G. Cunto-Amesty, P. Luo, and T. Kieber-Emmons, *Peptide mimotopes as surrogate antigens of carbohydrates in vaccine discovery.* Trends Biotechnol, 2002. **20**(5): p. 207-14.
  36. Felici, F., L. Castagnoli, A. Musacchio, R. Jappelli, and G. Cesareni, *Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector.* J Mol Biol, 1991. **222**(2): p. 301-10.
  37. D'Mello, F. and C.R. Howard, *An improved selection procedure for the screening of phage display peptide libraries.* J Immunol Methods, 2001. **247**(1-2): p. 191-203.
  38. Dybwad, A., O. Forre, J.B. Natvig, and M. Sioud, *Structural characterization of peptides that bind synovial fluid antibodies from RA patients: a novel strategy for identification of disease-related epitopes using a random peptide library.* Clin Immunol Immunopathol, 1995. **75**(1): p. 45-50.
  39. Deroo, S. and C.P. Muller, *Antigenic and immunogenic phage displayed mimotopes as substitute antigens: applications and limitations.* Comb Chem High Throughput Screen, 2001. **4**(1): p. 75-110.
  40. Houghton, R.L., M.J. Lodes, D.C. Dillon, L.D. Reynolds, C.H. Day, P.D. McNeill, R.C. Hendrickson, Y.A. Skeiky, D.P. Sampaio, R. Badaro, K.P. Lyashchenko, and S.G. Reed, *Use of multiepitope polyproteins in serodiagnosis of active tuberculosis.* Clin Diagn Lab Immunol, 2002. **9**(4): p. 883-91.
  41. Santamaria, H., K. Manoutcharian, L. Rocha, E. Gonzalez, G. Acero, T. Govezensky, L.I. Uribe, A. Olguin, J. Paniagua, and G. Gevorkian, *Identification of peptide sequences specific for serum antibodies from human papillomavirus-infected patients using phage display libraries.* Clin Immunol, 2001. **101**(3): p. 296-302.
  42. Kouzmitcheva, G.A., V.A. Petrenko, and G.P. Smith, *Identifying diagnostic peptides for lyme disease through epitope discovery.* Clin Diagn Lab Immunol, 2001. **8**(1): p. 150-60.
  43. De Bolle, X., T. Laurent, A. Tibor, F. Godfroid, V. Weynants, J.J. Letesson, and P. Mertens, *Antigenic properties of peptidic mimics for epitopes of the lipopolysaccharide from Brucella.* J Mol Biol, 1999. **294**(1): p. 181-91.



44. Al-Mariri, A., A. Tibor, P. Lestrade, P. Mertens, X. De Bolle, and J.J. Letesson, *Yersinia enterocolitica* as a vehicle for a naked DNA vaccine encoding *Brucella abortus* bacterioferritin or P39 antigen. *Infect Immun*, 2002. **70**(4): p. 1915-23.
45. Ruiz-Bravo, A., E. Moreno, and M. Jimenez-Valera, *Intestinal infection of BALB/c mice with Yersinia enterocolitica O9 causes major modifications in phenotype and functions of spleen cells*. *Microbiology*, 2001. **147**(Pt 11): p. 3165-9.
46. Ruiz-Bravo, A., E. Moreno, A. Sampedro, and M. Jimenez-Valera, *Experimental infection of mice with Yersinia enterocolitica serotype O9 by oral and parenteral routes: spreading and enterotropism of virulent yersiniae*. *Curr Microbiol*, 1999. **38**(5): p. 257-63.
47. Lerouge, I. and J. Vanderleyden, *O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions*. *FEMS Microbiol Rev*, 2002. **26**(1): p. 17-47.
48. Vinogradov, E., E. Fridrich, L.L. MacLean, M.B. Perry, B.O. Petersen, J.O. Duus, and C. Whitfield, *Structures of lipopolysaccharides from Klebsiella pneumoniae. Elucidation of the structure of the linkage region between core and polysaccharide O chain and identification of the residues at the non-reducing termini of the O chains*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(28): p. 25070-81.
49. Baldi, P.C., G.H. Giambartolomei, F.A. Goldbaum, L.F. Abdon, C.A. Velikovsky, R. Kittelberger, and C.A. Fossati, *Humoral immune response against lipopolysaccharide and cytoplasmic proteins of Brucella abortus in cattle vaccinated with B. abortus S19 or experimentally infected with Yersinia enterocolitica serotype 0:9*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1996. **3**(4): p. 472-6.
50. Elzer, P.H., R.H. Jacobson, S.M. Jones, K.H. Nielsen, J.T. Douglas, and A.J. Winter, *Antibody-mediated protection against Brucella abortus in BALB/c mice at successive periods after infection: variation between virulent strain 2308 and attenuated vaccine strain 19*. *Immunology*, 1994. **82**(4): p. 651-8.
51. Murphy, E.A., M. Parent, J. Sathiyaseelan, X. Jiang, and C.L. Baldwin, *Immune control of Brucella abortus 2308 infections in BALB/c mice*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2001. **32**(1): p. 85-8.
52. Araya, L.N., P.H. Elzer, G.E. Rowe, F.M. Enright, and A.J. Winter, *Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in BALB/c mice infected with Brucella abortus*. *J Immunol*, 1989. **143**(10): p. 3330-7.
53. Riley, G. and S. Toma, *Detection of pathogenic Yersinia enterocolitica by using congo red-magnesium oxalate agar medium*. *J Clin Microbiol*, 1989. **27**(1): p. 213-4.
54. Rohde, J.R., X.S. Luan, H. Rohde, J.M. Fox, and S.A. Minnich, *The Yersinia enterocolitica pYV virulence plasmid contains multiple intrinsic DNA bends which melt at 37 degrees C*. *J Bacteriol*, 1999. **181**(14): p. 4198-204.
55. Bansal, N., I. Sinha, and J.S. Viridi, *Virulence plasmid (pYV)-associated susceptibility of Yersinia enterocolitica to chlorine and heavy metals*. *J Appl Microbiol*, 2000. **89**(4): p. 663-7.